# TEMPLATEAKTIVITÄT VON MAKRO- UND MIKRONUKLEUS-CHROMATIN DES CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Margrit Riewe
aus Sindelfingen

1979

79 102

# TEMPLATEAKTIVITÄT VON MAKRO- UND MIKRONUKLEUS-CHROMATIN DES CILIATEN STYLONYCHIA MYTILUS

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Margrit Riewe
aus Sindelfingen

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

An dieser Stelle möchte ich Herrn Prof. Dr. D. Ammermann für die freundliche Anteilnahme und die Überlassung eines Arbeitsplatzes danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. J. Lipps, dem ich wertvolle Anregungen und Hinweise verdanke.

Vor allem aber möchte ich meiner Mutter und meinem Freund Wolde danken, die mich während der Anfertigung der Arbeit in jeder Hinsicht unterstützten und mit dazu beigetragen haben, daß diese Arbeit fertig werden konnte.

| | |
|---|---|
| Tag der mündlichen Prüfung: | 11. Januar 1979 |
| Dekan: | Prof. Dr. F. Oberwinkler |
| 1. Berichterstatter: | Prof. Dr. D. Ammermann |
| 2. Berichterstatter: | Prof. Dr. K.G. Grell |

# I N H A L T S V E R Z E I C H N I S


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. | Einleitung | 3 |
| 2. | Material und Methoden | 6 |
| 2.1. | Chemikalien | 6 |
| 2.2. | Untersuchungsobjekt und Kulturmethode | 6 |
| 2.2.1. | Kultur von Stylonychia mytilus | 6 |
| 2.2.2. | Kultur von Chlorogonium elongatum | 6 |
| 2.3. | Zellkern - Isolierung und - Trennung | 7 |
| 2.4. | Isolierung von Makronukleusanlagen | 7 |
| 2.5. | Isolierung von Chromatin | 9 |
| 2.6. | Isolierung von DNS | 9 |
| 2.7. | Isolierung von RNS-Polymerasen | 10 |
| 2.8. | Transkription in vitro | 10 |
| 2.9. | $^{3}$H-UTP Einbau in ganze Kerne | 11 |
| 2.10. | Bestimmung der Initiierungsstellen | 12 |
| 2.11. | Auftrennung von RNS | 13 |
| 2.11.1. | - auf SDS-Polyacrylamid-Gelen | 13 |
| 2.11.2. | - durch Sedimentation im linearen 5 % - 20 % Sucrosegradienten | 13 |
| 2.12. | Dissoziation und Rekonstitution von Chromatin | 13 |
| 2.13. | Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen | 14 |
| 2.14. | Analytische Methoden | 14 |
| 3. | Ergebnisse | 16 |
| 3.1. | Templateaktivität von Makronukleus-Chromatin | 16 |
| 3.2. | Konzentrationskinetik von E. coli RNS-Polymerase | 19 |
| 3.3. | Vergleich der Templateaktivität von Makronukleus-, Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Chromatin | 19 |
| 3.4. | In vitro Transkription von DNS | 23 |
| 3.5. | Bestimmung der Initiierungsstellen von Makro- und Mikronukleus-Chromatin | 25 |

| | | Seite |
|---|---|---|
| 3.6. | Templateaktivität von Makro- und Mikronukleus-Chromatin mit E. coli und Weizenkeim RNS-Polymerase | 27 |
| 3.7. | $^{3}$H-UTP Einbau in ganze Makro- und Mikronuklei und Makronukleusanlagen | 27 |
| 3.8. | Größe des Transkripts | 30 |
| 3.8.1. | Makro- und Mikronukleus-Chromatin | 30 |
| 3.8.1.1. | - durch Sedimentation im linearen 5 % - 20 % Sucrosegradienten | 30 |
| 3.8.1.2. | - auf SDS Polyacrylamid-Gelen | 32 |
| 3.8.2. | Makro- und Mikronuklei | 32 |
| 3.9. | Dissoziation und Rekonstitution von Makro- und Mikronukleus-Chromatin | 34 |
| 3.10. | Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen | 38 |
| 4. | Diskussion | 39 |
| 5. | Zusammenfassung | 45 |
| 6. | Abkürzungen | 47 |
| 7. | Literaturverzeichnis | 49 |

# 1. EINLEITUNG

Chromatin besteht aus DNS, die mit RNS, Histonen und Nichthistonproteinen assoziiert ist. Histone sind relativ kleine, basische Proteine, die sich fast immer in 5 Fraktionen unterteilen lassen. Sie stimmen bei verschiedenen Organismen weitgehend überein (De Lange, 1975). Die Nichthistone sind hingegen verschieden innerhalb der Gewebe einer Art und auch zwischen verschiedenen Arten (Elgin and Weintraub, 1975). Etwa 90 % der DNS besitzt als Grundstruktur das Nukleosom, dessen Core einen Durchmesser von ungefähr 100 A und ein Molekulargewicht von 200 000 - 210 000 aufweist. Es besteht aus 8 Histonmolekülen (Oktamer), je 2 Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 und einem 140 $\pm$ 7 Nukleotide-Paare langen DNS-Stück, das auf der Oberfläche dieser Struktur liegt (Allfrey et al., 1976). Zwischen diesen Core-Partikeln liegt ein etwa 60 Basenpaare langes DNS-Stück, das mit Histon H1 assoziiert ist. Während das Core-Partikel bisher bei allen untersuchten Eukaryonten die gleichen Abmessungen zeigte, ist die Länge der DNS zwischen den Cores variabel (Kornberg, 1977; Thomas, 1978). Wie die Nichthistone mit diesen Nukleosomen verknüpft sind, ist weitgehend unbekannt.

Mehrere Arbeitsgruppen (Bonner et al., 1968; Koslov and Georgiev, 1970; Kurashina et al., 1970) haben gezeigt, daß in differenzierten Zellen nur ein Teil der genetischen Information der Transkription zugänglich ist, der andere Teil wird reprimiert. Während den Histonen eine unspezifische gen-inaktivierende Wirkung zugeschrieben wird (Marushige and Bonner, 1966; Paul and Gilmour, 1968), gaben die Gewebe- und Artspezifität der Nichthistone, sowie ihr hoher Gehalt in transkriptionsaktiven Kernen zu der Vermutung Anlaß, daß sie bei der Regulation der Genaktivität eine spezifische Rolle spielen. Durch Rekonstitutionsversuche am Globin- und Histongen wurde diese

Annahme weiter bestätigt (Frenster, 1965; Paul et al., 1973; Barrett et al., 1974; Chiu et al., 1975; Kleinsmith et al., 1976; Stein et al., 1976). Wahrscheinlich spielen bei diesen Aktivierungsprozessen Modifikationen der Nichthistone eine entscheidende Rolle. Es gibt aber bisher kein System, an dem die Reihenfolge der Ereignisse bei der Aktivierung der RNS-Synthese klar verfolgt werden kann.

Der hypotriche Ciliat Stylonychia mytilus eignet sich durch seinen Kerndimorphismus ganz besonders für die Untersuchung von Genaktivierungsprozessen. Der DNS-reiche Makronukleus, der die vegetativen Funktionen der Zelle steuert, unterscheidet sich in seiner Organisation von der des diploiden Mikronukleus, der vor allem für generative Funktionen bei der geschlechtlichen Fortpflanzung benötigt wird: Während der Mikronukleus reich an repetetiven Sequenzen ist, fehlen diese im Makronukleus, sie scheinen mit dem DNS-Verlust bei der Makronukleusentwicklung verloren gegangen zu sein. Die kinetische Komplexität der einfach vorkommenden Sequenzen im Mikronukleus ist mit $1{,}45 \times 10^{12}$ Dalton etwa 500 x größer als die von E. coli-DNS. Im Makronukleus beträgt sie $3{,}1 \times 10^{10}$ Dalton, das ist 12 x komplexer als E. coli-DNS (korrigiert für GC - Gehaltsunterschiede). Bei der Neubildung des Makronukleus, die bei jeder geschlechtlichen Fortpflanzung (Konjugation) durchgeführt wird, übernimmt dieser Kern also nur 1 % der DNS-Sequenzen des Mikronukleus. Die übrigen 99 % Mikronukleus-DNS-Sequenzen sind offenbar für die Funktion der Zelle entbehrlich (Ammermann et al., 1974; Steinbrück, 1976).

Ein weiterer Unterschied ist, daß der Mikronukleus echte Chromosomen besitzt, und seine DNS ein hohes Molekulargewicht hat. Im Makronukleus der meisten Ciliaten ließen sich bisher keine Chromosomen, die mit denen der Mikronuklei vergleichbar sind, nachweisen. Damit stimmt über-

ein, daß die DNS des Makronukleus bei Stylonychia mytilus in "gene-sized pieces" angelegt und wesentlich niedermolekularer ist (Elsevier et al., 1978; Lipps and Steinbrück, 1978; Lipps et al., im Druck). Der Nukleosomenrepeat ist auch unterschiedlich: Im Mikronukleus beträgt er 200 Basenpaare, im Makronukleus 220 Basenpaare (Lipps and Morris, 1977). Außerdem wurden im Makronukleus viele Nukleolen nachgewiesen, während der Mikronukleus keine Nukleolen besitzt.

Weitgehend ungeklärt ist die Funktion des Mikronukleus während des vegetativen Wachstums und während der vegetativen Zellteilung. Es gibt Hinweise dafür, daß der Mikronukleus einiger Ciliaten total inaktiv ist (Sonneborn, 1954; Alfert and Das, 1959; Kimball, 1964; Gorovsky, 1965; Gorovsky and Woodard, 1968, 1969). Andererseits konnte vor allem durch autoradiographische Untersuchungen an Paramecium aurelia (Pasternak, 1967), Paramecium caudatum (Moses, 1950; Rao and Prescott, 1967), an Tetrahymena pyriformis (Murti and Prescott, 1970) und auch an Stylonychia mytilus (Ammermann, 1970) eine geringe RNS-Synthese des Mikronukleus nachgewiesen werden. Diese RNS-Synthese ist -zumindest bei Stylonychia mytilus- aber nicht essentiell für die Zelle, denn diese Art kann auch nach Entfernen des Mikronukleus leben (allerdings kann sie die Konjugation nicht mehr erfolgreich durchführen) (Ammermann, 1965).

Es schien daher besonders interessant, das Chromatin der verschiedenen Kerne von Stylonychia mytilus hinsichtlich der Genaktivierung zu vergleichen, da hier eventuell schon in vivo aktives und inaktives Chromatin innerhalb einer Zelle getrennt vorliegen.

# 2. MATERIAL UND METHODEN

## 2.1. Chemikalien

ATP, GTP, CTP, UTP und DTE wurden von Serva, Heidelberg, $^3$H-UTP (spezifische Aktivität 40 Ci/mmol) von Amersham, England und Membranfilter Nr. 11 308 von der Sartorius-Membranfiltergesellschaft, Göttingen, bezogen. E. coli MRE 600, Kalbsthymus-DNS, Proteinase K und RNase A wurde von Merck, Darmstadt, RNase T1 von Worthington, Acrylamid, Gewebelöser und Coomassie Brilliant Blau R 250 von Serva, Heidelberg, geliefert. Scintillator Unisolve 1 wurde von Zinsser, Frankfurt, Baycovin von Bayer und Agarose von den British Drug House (BDH) bezogen.
Frischen, unbehandelten Weizenkeim lieferte die Keimdiät GmbH Augsburg.
Ribosomale RNS von Stylonychia mytilus wurde freundlicherweise von Herrn A. Nock zur Verfügung gestellt.

## 2.2. Untersuchungsobjekt und Kulturmethode

### 2.2.1. Kultur von Stylonychia

Die vorliegende Arbeit wurde mit dem hypotrichen Ciliaten Stylonychia mytilus, Syngen I (Ammermann, 1965) durchgeführt. Die Tiere wurden in Petrischalen mit Pringsheim-Lösung (0,85 mM $Ca(NO_3)_2 \times 4\ H_2O$, 0,35 mM KCl, 0,08 mM $MgSO_4 \times 7\ H_2O$, 0,11 mM $Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt, gehalten. Gefüttert wurden die Tiere täglich mit Chlorogonium (Ammermann et al., 1974).

### 2.2.2. Kultur von Chlorogonium

Der grüne Flagellat Chlorogonium elongatum wurde unter sterilen Bedingungen in folgendem Kulturmedium gehalten

(1 g Beefextrakt (Difco), 2 g Bacto-Trypton (Difco), 2 g Yeast-Extrakt (Difco) und 1 g $CH_3COONa$ (alles gelöst in 1 Liter Pringsheim-Lösung), und waren einem 12 : 12 Stunden Licht - Dunkel Wechsel unterworfen.
Zum Verfüttern wurden die Zellen abzentrifugiert und in wenig Pringsheim-Lösung aufgenommen.

## 2.3. Zellkern - Isolierung und - Trennung

Vor der Kernisolierung mußten die Tiere so lange hungern, bis keine vollen Futtervakuolen mehr erkennbar waren (im allgemeinen 48 Stunden). Die Zellen wurden dann auf Polyamidgaze mit 30 µm Maschenweite (Vereinigte Seidenwebereien, Krefeld) gesammelt und in eiskaltes Lysiermedium (100 mg Spermidinphosphat x 6 $H_2O$, 5 ml Triton X-100 / 1000 ml) gebracht. Nach 1 - 2 Minuten waren alle Zellen lysiert. Die freien Zellkerne wurden dann durch die Gaze gespült und durch Zentrifugation (10 Min., 1000 x g, 4° C) gesammelt. Das Pellet enthielt Makro- und Mikronuklei, sowie sehr viele farblose Granula.
Zur anschließenden Trennung von Makro- und Mikronuklei wurden die Kerne in Lysiermedium aufgenommen und 10 Minuten gerührt. Durch wiederholte Filtration über Nickelgaze mit 5 µm Maschenweite (Ammermann et al., 1974), konnte eine sehr gute Trennung der beiden Kernarten erzielt werden. Die Zentrifugation durch 1,4 M Saccharose erbrachte eine weitere Reinigung der Kerne von Cytoplasma und Futterresten.

## 2.4. Isolierung von Makronukleusanlagen

Makronukleusanlagen im Riesenchromosomenstadium wurden nach der Methode von Ammermann et al. (1974) isoliert. Zuerst wurde das Kulturmedium durch wiederholtes Absetzen lassen der Zellen und Dekantieren des Überstandes auf ein

geringes Volumen (etwa 200 ml) konzentriert, das dann mit dem gleichen Volumen doppelt konzentriertem Lysiermedium (100 mg Spermidinphosphat x 6 $H_2O$, 5 ml Triton X-100, 172 g Saccharose / 1000 ml) vermischt wurde. Die Lösung wurde bis zur Lyse der Tiere gerührt (2 - 3 Minuten). Pro 100 ml Flüssigkeit wurde dann 1 ml 3,3 M $CaCl_2$-Lösung dazugegeben. Anschließend wurden die Makronukleusanlagen über Polyamidgaze mit 25 µm Maschenweite gefiltert und durch Zentrifugation (10 Min., 1000 x g, 4° C) gesammelt.

Abbildungen von Stylonychia mytilus Makro- und Mikronuklei, sowie von Makronukleusanlagen.

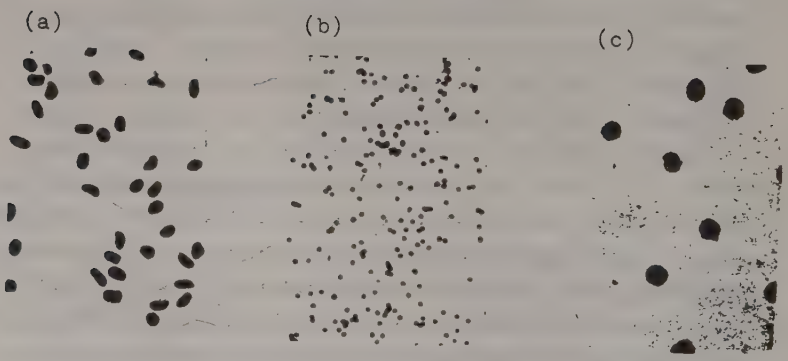



Abbildung 1: Feulgen gefärbte Präparationen von Stylonychia mytilus Makronukleu (a), Mikronuklei (b) und Makronukleusanlagen (c) x 170.

## 2.5. Isolierung von Chromatin

Die Isolierung von Chromatin erfolgte nach der Methode von Johns and Forrester (1969), modifiziert nach Wilson et al., (1975).
Zuerst wurde das Kernsediment in 50 Volumina 80 mM NaCl, 20 mM EDTA pH 6,3 homogenisiert und 10 Minuten bei 3000 x g und 4° C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zwei bis drei Mal wiederholt. Zur Reinigung von noch anhaftenden cytoplasmatischen Verunreinigungen wird das Chromatin jetzt mit 0,30 M NaCl, 20 mM EDTA pH 6,3 extrahiert, homogenisiert und abzentrifugiert (10 Min., 3000 x g, 4° C). Das Chromatin wird nun mit 2 mM Tris pH 7,9, 0,1 mM EDTA pH 6,3 resuspendiert und nach Marushige and Bonner (1966) durch Zentrifugation durch 1,7 M Saccharose (Beckmann Ultrazentrifuge, SW 27, 22 000 x g, 180 Min., 4° C) weiter gereinigt.
Das Pellet wird in 2 mM Tris pH 7,9, 0,1 mM EDTA pH 6,3 aufgenommen und innerhalb 12 Stunden nach der Isolierung für Transkriptionsversuche verwendet.

## 2.6. Isolierung von DNS

Die isolierten Kerne wurden in 2 ml 0,15 M NaCl, 0,2 M EDTA ph 10 aufgenommen, durch Zugabe von SDS (Endkonzentration 2 %) lysiert und mit 400 µg/ml Proteinase K über Nacht bei 37° C inkubiert. Zur Extraktion der DNS wurde das Lysat 3 Mal mit Phenol-Chloroform (Volumenverhältnis 1:1, Phenol mit Wasser gesättigt) und anschließend 3 Mal mit Chloroform-Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde nun mit Essigsäure auf pH 5 eingestellt und mit 50 µg/ml RNase A und 25 EE/ml RNase T1 (beide für 10 Min. in 0,15 M Natriumacetatpuffer pH 5 auf 80° C erhitzt) inkubiert. Nun wurde die Lösung wieder auf 2 % SDS gebracht, mit Proteinase K inkubiert und dann mehrmals mit Phenol-Chloroform ausgeschüttelt (Lipps and Steinbrück, 1978).

Die DNS-Fraktion wurde dann durch Zugabe von festem $CsCl_2$ (Merck, Suprapur) auf eine Dichte von 1,6990 g $cm^{-3}$ eingestellt und in Polyallomerröhrchen im Ti 60 Rotor der Beckmann L5-65-Ultrazentrifuge für 48 - 92 Stunden bei 25° C und 45 000 rpm zentrifugiert. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation in 0,2 ml Fraktionen aufgetrennt, die Absorption bei 260 nm gemessen und die DNS-haltigen Fraktionen gesammelt (Hennig et al., 1970).
Nach einer Fällung mit absolutem Alkohol wurden die Präzipitate in 1 x SSC (0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumcitrat) gelöst und gegen den selben Puffer über Nacht dialysiert.

## 2.7. Isolierung von RNS-Polymerasen

E. coli RNS-Polymerase wurde nach Burgess (1969) bis zur Fraktion 4 isoliert und durch Affinitätschromatographie an DNS-Agarose weiter gereinigt (Nüßlein and Heyden, 1972).
Die Isolierung der Weizenkeimpolymerase erfolgte nach der Methode von Jendrisak and Burgess (1975).
Die spezifische Aktivität der Enzyme betrug 500 EE/ml.

## 2.8. Transkription in vitro

Die Messung der Templateaktivitäten in vitro wurden in folgenden Inkubationsmedien durchgeführt. Sie enthielten in einem Endvolumen von 0,200 ml:

1. Inkubationsmedium nach Blüthmann et al., 1975

0,03 M Tris pH 7,9
0,03 M $MgCl_2$
0,13 M $NH_4Cl$
0,10 mM DTE
je 2,50 mM ATP, CTP, GTP, UTP
50,00 /uCi/ml $^3$H-UTP

2. Inkubationsmedium nach Wilson et al., 1975

0,03 M Tris pH 7,9
0,10 M KCl
3,00 mM $MnCl_2$
1,20 mM Mercaptoethanol
5,00 % Glycerin
je 2,00 mM ATP, CTP, GTP, UTP
50,00 µCi/ml $^3$H-UTP

3. Inkubationsmedium nach Lipps, pers. Mitteilung

0,01 M Tris pH 7,9
0,01 M $MgCl_2$
0,10 M KCl
0,10 mM DTE
0,10 mM EDTA
je 0,50 mM ATP, CTP, GTP
0,10 mM UTP
25,00 µCi/ml $^3$H-UTP

Pro Ansatz wurden 10 EE E. coli oder Weizenkeim RNS-Polymerase (500 EE / ml) und 2 - 20 µg Chromatin, bzw. DNS als Template eingesetzt. Das Reaktionsgemisch wurde zwischen 10 und 90 Minuten bei 37° C inkubiert und dann durch Zugabe von 100 µg Träger-DNS (Heringsperm-DNS von Serva, Heidelberg, in 0,01 M EDTA, 70 mg/ml $Na_4P_2O_7$) und mit 0,5 ml 1 M TCA gestoppt. Nach 5 Minuten im Eisbad wurde das Präzipitat auf Nitrocellulosefilter filtriert, die Filter mit 1 % TCA gewaschen, bei 80° C getrocknet und die Radioaktivität auf den Filtern im Packard Tri-Carb gezählt.

## 2.9. $^3$H-UTP Einbau in ganze Makro- und Mikronuklei

Sofort nach der Isolierung wurden die Zellkerne in 4 % PVP, 0,25 M Saccharose, 0,18 mM Spermidinphosphat und 25 mM Tris pH 8 aufgenommen. Mikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die Kerne in diesem Puffer mindestens 60 Minu-

ten ihre Stabilität behielten. Die Inkubation erfolgte bei 22° C in folgendem Medium (Endvolumen 1 ml):

3,00 mM $MgCl_2$
2,70 mM L-Cystein
4,00 mM $MnCl_2$
0,05 M $(NH_4)_2SO_4$
0,12 M KCl
0,12 M NaCl
je 0,10 mM CTP, GTP
1,00 mM ATP
20,00 µCi/ml $^3$H-UTP

Nach der Fällung mit eiskalter 10 % TCA wurde das Präzipitat abzentrifugiert (5 Min., 5000 x g, 4° C), 2 Mal mit 5 % kalter TCA (je 5 ml), 1 Mal mit kaltem 100 % Alkohol (je 1 ml) gewaschen und mit 150 µl Gewebelöser versetzt.

## 2.10. Bestimmung der Initiierungsstellen

Die relative Anzahl der Initiierungsstellen wurde nach der Methode von Hyman and Davidson (1970), wie beschrieben bei Cedar and Felsenfeld (1973) bestimmt. Das Inkubationsmedium enthielt in 0,2 ml:

10,00 mM Tris pH 7,9
1,00 mM $MnCl_2$
je 0,08 mM ATP, GTP, UTP
50,00 µCi/ml $^3$H-UTP

Nach 15 Minuten wurde die Initiierungsreaktion durch Zugabe von 64 µl 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ gestoppt. Die Ablösung eines Transkripts in hoherSalzkonzentration wurde durch Zugabe von CTP (Endkonzentration 0,063 mM und $MgCl_2$ (Endkonzentration 5 mM) gestartet. Nach 20 Minuten wird das Transkript mit 0,5 ml 1 M TCA und 20 µl Carrier-DNS gefällt, 3 Mal mit 1 % TCA gewaschen und anschließend die Radioaktivität gemessen.

## 2.11. Auftrennung von RNS

### 2.11.1. Auftrennung von RNS auf SDS-Polyacrylamid-Gelen

Die SDS-Polyacrylamid-Geleletrophorese erfolgte nach Loening (1969). Als Standart wurde rRNS (Molekulargewicht 1,3 x $10^6$ Dalton + 0,7 x $10^6$ Dalton) von Stylonychia mytilus verwendet. Die Elektrophorese dauerte 180 Minuten bei 5 mA / Gel. Die densitometrische Bestimmung der aufgetrennten RNS wurde mit einem Joyce - Loebl Scan 400 durchgeführt. Zur Bestimmung der Radioaktivitätsverteilung im Gel wurden diese mit einem Joyce - Loebl Gel-Slicer in 1 mm Scheibchen geschnitten. Die RNS wurde mit 0,25 ml 0,1 % SDS eluiert und im Packard Liquid Scintillation Spectrometer mit Unisolve 1 als Scintillator gezählt.

### 2.11.2. Auftrennung von RNS durch Sedimentation im linearen 5 - 20 % Sucrosegradienten

Zur Bestimmung der Größe der in vitro transkribierten RNS wurde nach 10 Minuten Inkubation der Transkriptionsansatz von 0,200 ml mit 5 µg Makro- oder Mikronukleus-Chromatin durch Zugabe von SDS und Bavcovin in einer Endkonzentration von je 1 % gestoppt. Je 0,100 ml des klaren Überstandes wurden auf 4,5 ml eines linearen Sucrosegradienten (5 - 20 %) in 0,01 M Tris pH 7,2, 0,001 M EDTA, 0,01 % SDS geschichtet und 6 Stunden bei 50 000 rpm im SW 61 Rotor zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden durch Austropfen 20 Fraktionen gesammelt und die TCA-fällbare Radioaktivität in den Fraktionen gemessen (Blüthmann, 1973).

## 2.12. Dissoziation und Rekonstitution von Chromatin

Aus Makro- und Mikronuklei wurde Chromatin isoliert und in einer Endkonzentration von etwa 200 µg/ml in 3 M NaCl und 5 M Harnstoff über Nacht dissoziiert (Huang and Huang,

1969; Spelsberg et al., 1972). Das dissoziierte Material wird 2 Mal 10 sec. homogenisiert (Sorvall - Homogenisator) und dann von cytoplasmatischen Verunreinigungen durch Zentrifugation (1000 x g, 2 Min., 4° C) gereinigt. Zur Rekonstitution wurde das dissoziierte Material jeweils 8 Stunden gegen 1 M NaCl, 0,5 M NaCl und schließlich gegen 10 mM Tris pH 7,9 dialysiert.
Die Trennung des rekonstituierten Materials von freien Proteinen in den einzelnen Fraktionen erfolgte durch Zentrifugation im Ti 50 Rotor, bei 22 000 rpm, für 16 Stunden (Bekhor et al., 1969). Die Sedimente wurden in 10 mM Tris pH 7,9 aufgenommen, gegen den gleichen Puffer 8 Stunden dialysiert und anschließend die Transkriptionsaktivität der einzelnen Fraktionen nach der oben beschriebenen Methode bestimmt (Inkubationsmedium nach Lipps).

## 2.13. Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen

Nach der Methode von Laemmli (1970) wurden durch diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese die verschiedenen Fraktionen der oben beschriebenen Rekonstitutionsexperimente aufgetrennt. Dazu wurden die Proben nach der Zentrifugation in der Ultrazentrifuge in destilliertem Wasser aufgenommen, 4 Stunden gegen das gleiche Medium dialysiert, anschließend im Gefriertrockner getrocknet, in Probepuffer gelöst und bei 80° C denaturiert. Die Elektrophorese dauerte 12 Stunden bei 40 mV. Das Gel wurde mit Coomassie Brilliant Blau 2 Stunden gefärbt und dann mit Methanol-Essigsäure entfärbt.

## 2.14. Analytische Methoden

Durch Messung der Extinktion bei 260 nm in Quarzküvetten wurde die DNS-Konzentration bestimmt. Für eine Extinktion von 1,0 wurde eine DNS-Konzentration von 50 µg/ml ange-

nommen. Zur Kontrolle wurde die DNS-Konzentration noch nach der Diphenylamin - Methode (Burton, 1968) bestimmt. Die Proteinbestimmung erfolgte nach der Methode von Lowry et al., (1951), mit Albumin aus Rinderserum als Standard.

# 3. ERGEBNISSE

## 3.1. Templateaktivität von Makronukleus-Chromatin

Im Gegensatz zu den Prokaryonten, wo die DNS nicht mit Histonen assoziiert ist, steht die DNS der Eukaryonten in Interaktion mit sauren und basischen Proteinen, die die RNS-Synthese der DNS, an die sie gebunden sind, aktivieren oder hemmen können. Viele Arbeitsgruppen konnten in den letzten Jahren nachweisen (Huang and Bonner, 1962; Marushige and Bonner, 1966; Paul and Gilmour, 1968; Allfrey et al., 1963), daß Eukaryontenchromatin nur etwa 10 % - 20 % der Templateaktivität von reiner DNS zeigt.

Die charakteristischen Vorgänge während der geschlechtlichen Fortpflanzung (Konjugation) von S. mytilus, wo es während der Entwicklung der sogenannten Makronukleusanlage zu einem Anstieg des DNS-Gehalts und zur Bildung von Riesenchromosomen kommt, die kurze Zeit später wieder abgebaut werden, wobei 90 % der DNS verloren geht, machten es besonders interessant zu untersuchen, ob sich Makronukleus-Chromatin in Bezug auf die Templateaktivität wie ein typischer Eukaryont verhält. Aus diesem Grund wurde die Templateaktivität von Makronukleus-Chromatin mit der von Kalbsthymus-Chromatin und reiner Makronukleus-DNS verglichen.

Abbildung 2 zeigt, daß nach zuerst linearem Anstieg des $^{3}$H-UTP Einbaus nach etwa 90 Minuten für alle 3 Präparationen eine Sättigung erreicht wird. Dabei erreicht isoliertes Makronukleus-Chromatin mit E. coli-RNS-Polymerase etwa 10 % der Templateaktivität von reiner DNS. Ein Vergleich des $^{3}$H-UTP Einbaus von Makronukleus-Chromatin mit isoliertem Kalbsthymus-Chromatin läßt keinen signifikanten Unterschied erkennen.

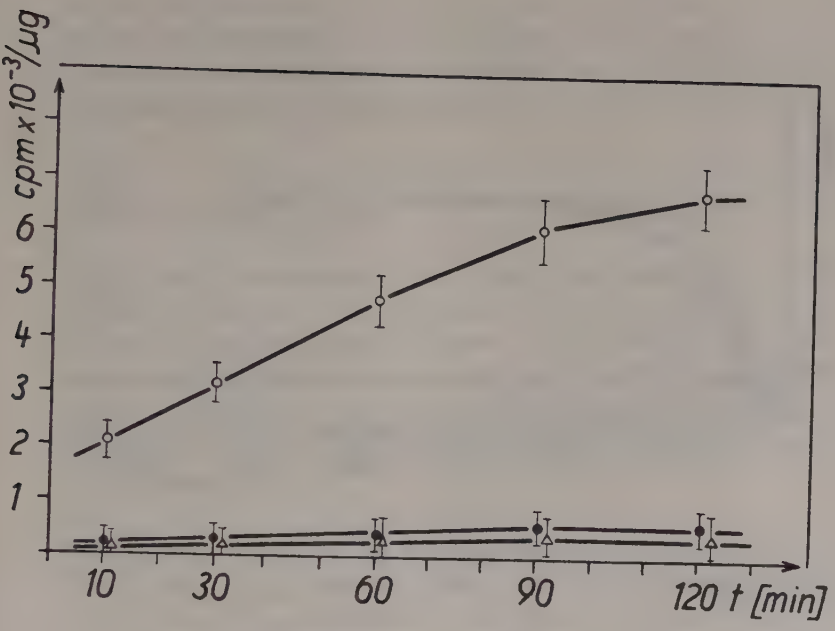



Abb. 2
Templateaktivität von Makronukleus-Chromatin
Der Testansatz enthielt 13,0 /ug S. mytilus Makronukleus-DNS -o—o-, 12,48 /ug Makronukleus-Chromatin -●—●-, 12,48 /ug Kalbsthymus-Chromatin -▲—▲- und 10 EE E. coli RNS-Polymerase.

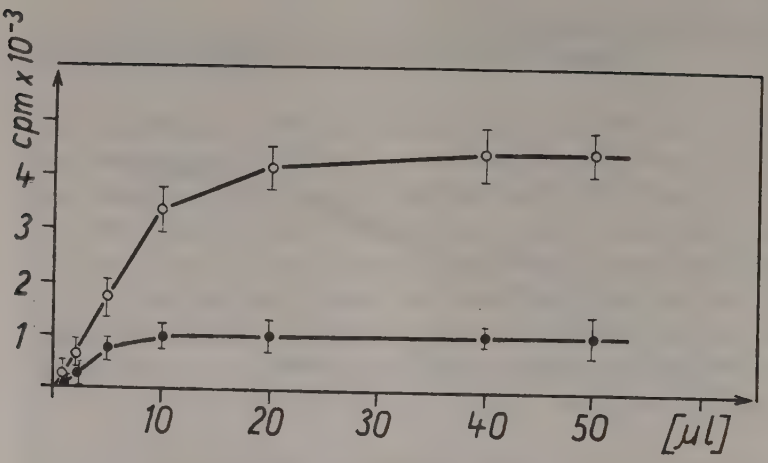



Abb. 3
Abbildung 3 gibt den Einbau von $^{3}$H-UTP in S. mytilus Makronukleus-DNS-o—o-und Makronukleus-Chromatin —•—•- mit steigender E. coli RNS-Polymerase Konzentration wieder. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37° C.

Dieses Ergebnis macht deutlich, daß das isolierte Chromatin vom Makronukleus mit exogener RNS-Polymerase die gleiche Templateaktivität aufweist, wie isoliertes Chromatin von anderen Eukaryontenzellen.

## 3.2. Konzentrationskinetik von E. coli RNS-Polymerase

Um optimale Bedingungen für Transkriptionsversuche zu erhalten, sollte in diesem Versuch die Kinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in Abhängigkeit von der E. coli RNS-Polymerase Konzentration untersucht werden. Dazu wurden 5 µg Makronukleus-Chromatin oder Makronukleus-DNS mit steigenden Konzentrationen E. coli RNS-Polymerase 30 Minuten bei 37° C inkubiert.

Man erkennt, daß bei S. mytilus Makronukleus-Chromatin mit 5 EE E. coli RNS-Polymerase und bei Makronukleus-DNS mit 10 EE E. coli RNS-Polymerase eine Sättigung auftritt. Um exogene RNS-Polymerase im Überschuß zu haben, wurden in allen weiteren in vitro Transkriptionsversuchen 10 EE E. coli RNS-Polymerase eingesetzt.

## 3.3. Templateaktivität von Makronukleus-, Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Chromatin

Die unterschiedliche Organisation von Stylonychia mytilus Makro- und Mikronuklei und ihre unterschiedlichen Funktionen machten es besonders interessant, sie hinsichtlich ihrer Templateaktivität zu vergleichen. Daher wurde nach der oben beschriebenen Methode Chromatin isoliert und unter den oben beschriebenen Bedingungen inkubiert. Um auszuschließen, daß ein unterschiedlicher $^{3}$H-UTP Einbau durch die Anwesenheit bestimmter Ionen im Inkubationsmedium verursacht wird, wurde der Versuch mit 3 verschiedenen Inkubationsmedien durchgeführt.

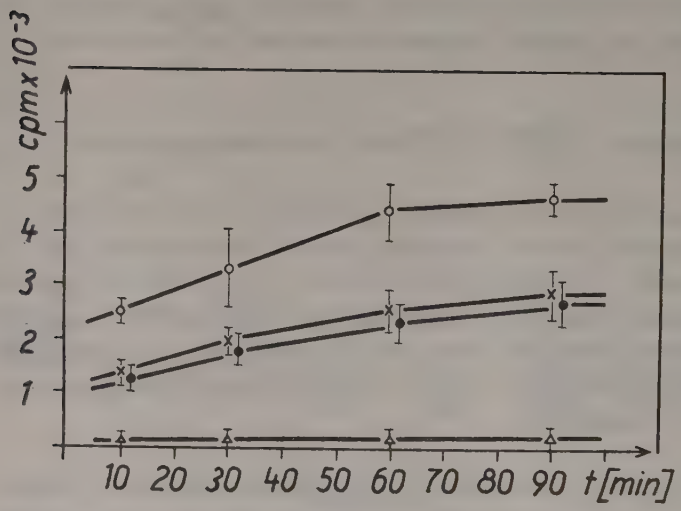



Abb. 4
Zeitkinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in Makronukleus-, Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Chromatin. Der Reaktionsansatz (0,? ml) enthielt je 13 µg Makronukleus-, Mikronukleus- oder Makronukleusanlagen-Chromatin und 10 EE E. coli RNS-Polymerase. Im Inkubationsmedium waren 0,03 M Tris pH 7,9, 0,03 M $MgCl_2$, 0,13 M $NH_4Cl$, 0,1 mM DTE, je 2,5 mM ATP, CTP, GTP, UTP und 50 µCi/ml $^{3}$H-UTP (Blüthmann et al., 1975).
-o—o- Makronukleus-Chromatin
-x—x- Mikronukleus-Chromatin
-•—•- Makronukleusanlagen-Chromatin
-Δ—Δ- Makronukleus-Chromatin, inkubiert ohne E. coli RNS-Polymerase

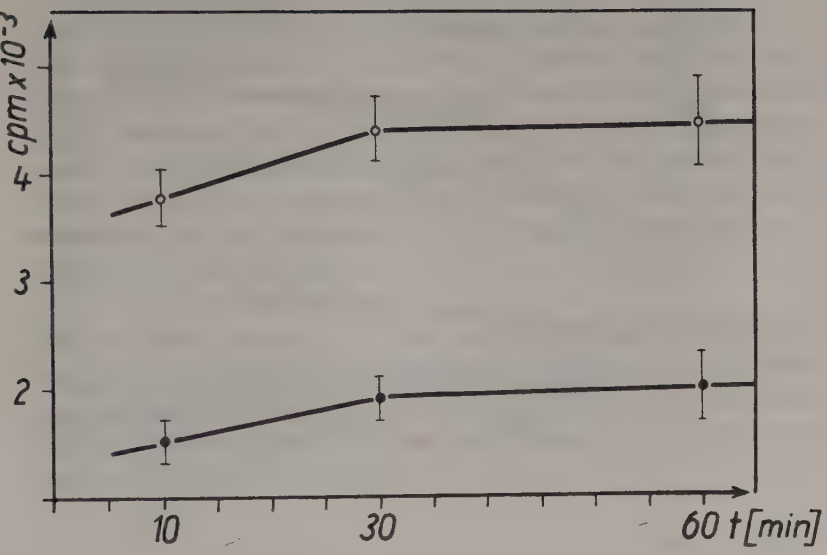



Abb. 5
Zeitkinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in S. mytilus Makronukleus- und Mikronukleus-Chromatin. Der Reaktionsansatz (0,2 ml) enthielt je 20 µg Makronukleus- oder Mikronukleus-Chromatin und 10 EE E. coli RNS-Polymerase. Im Inkubationsmedium waren 0,03 M Tris pH 7,9, 0,1 M KCl, 3mM $MgCl_2$, 3 mM $MnCl_2$, 1,2 mM Mercaptoethanol, 5 % Glyzerin, je 2 mM ATP, CTP, GTP, UTP und 50 µCi/ml $^{3}$H-UTP (Wilson et al., 1975).
-o—o- Makronukleus-Chromatin
-•—•- Mikronukleus-Chromatin

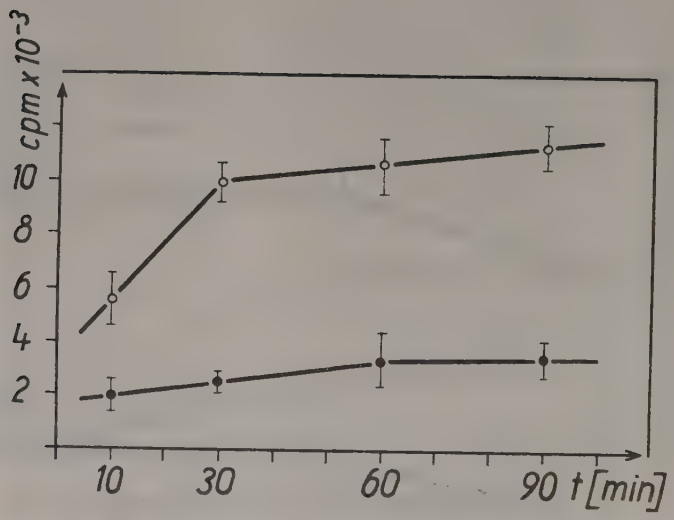



Abb. 6
Zeitkinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in S. mytilus Makronukleus- und Mikronukleus-Chromatin. Der Reaktionsansatz (0,2 ml) enthielt je 2 µg Makronukleus- oder Mikronukleus-Chromatin und 10 EE E. coli RNS-Polymerase. Im Inkubationsmedium waren 0,01 M Tris pH 7,9, 0,01 M $MgCl_2$, 0,1 M KCl, 0,1 mM DTE, 0,1 mM EDTA, je 0,5 mM ATP, GTP, CTP, UTP und 25 µCi/ml $^{3}$H-UTP (Lipps, pers. Mitteilung).
-o—o- Makronukleus-Chromatin
-•—•- Mikronukleus-Chromatin

Ungeklärt war bisher auch die Frage, welche RNS-Synthese Rate die während der sexuellen Fortpflanzung gebildete Makronukleusanlage im Riesenchromosomenstadium aufweist. Autoradiographische Untersuchungen ergaben, daß diese Makronukleusanlage in vivo ziemlich inaktiv ist.Auch ist ihre DNS mit der vom Mikronukleus vergleichbar (Ammermann, 1971; Ammermann et al., 1974). Andererseits ist das Chromatin in der Makronukleusanlage nicht so kondensiert wie im Mikronukleus, auch der Nukleosomenrepeat und die Zusammensetzung der Histone gleichen eher dem Makronukleus (Lipps and Morris, 1977).

Aus den Abbildungen 4 - 6 wird deutlich, daß die Templateaktivität des isolierten Chromatins vom Mikronukleus und der Makronukleusanlage bei unterschiedlichen Inkubationsbedingungen zwischen 30 % und 60 %, bezogen auf das Makronukleus-Chromatin, beträgt.

## 3.4. In vitro Transkription von DNS

In diesem Versuch sollte geprüft werden, ob die unterschiedliche Templateaktivität der Chromatinpräparationen auf eine unterschiedlich gebaute DNS zurückzuführen ist oder durch eine unterschiedliche Zugänglichkeit, also durch die Chromatinstruktur, verursacht wird.

Nach der beschriebenen Methode wurde die DNS von S. mytilus Makro- und Mikronuklei, sowie Kalbsthymus-DNS isoliert und anschließend unter gleichen Bedingungen transkribiert. Wie Abbildung 7 zeigt, weisen alle DNS Präparationen eine ähnliche Transkriptionsaktivität auf, die im Durchschnitt für Makronukleus- und Kalbsthymus-DNS 10 Mal höher und für Mikronukleus- und Makronukleusanlagen 20 Mal höher ist, verglichen mit dem korrespondierenden Chromatin. Daraus geht klar hervor, daß nicht eine unterschiedlich gebaute DNS die Ursache für die geringe Templateaktivität des Chromatins vom Mikronukleus und der Makronukleusanlage sein kann, vielmehr

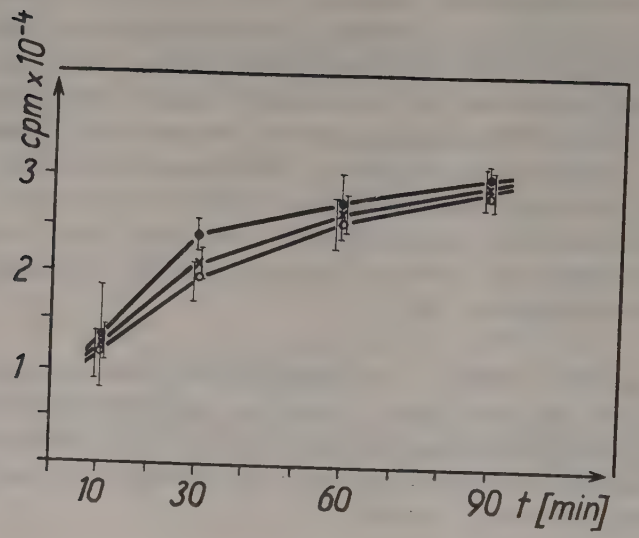



Abb. 7
Zeitkinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in S. mytilus Makronukleus-, Mikronukleus- und Kalbsthymus-DNS. Der Reaktionsansatz enthielt je 21 µg Makronukleus-, Mikronukleus- oder Kalbsthymus-DNS und 10 EE E.coli RNS-Polymerase. Für das Inkubationsmedium siehe Abb. 4.
-o—o- Makronukleus-DNS
-●—●- Mikronukleus-DNS
-X—X- Kalbsthymus-DNS

ist die Restriktion durch die Chromatinstruktur bedingt. Außerdem wird deutlich, daß bei Stylonychia mytilus aktives und inaktives Chromatin in verschiedenen Kernen innerhalb einer Zelle vorkommt.

## 3.5. Bestimmung der Initiierungsstellen von Makro- und Mikronukleus-Chromatin

Die Ergebnisse des $^{3}$H-UTP Einbaus in verschiedene DNS Präparationen zeigen, daß die geringere Templateaktivität des Mikronukleus-Chromatins auf seine Chromatinstruktur zurückzuführen ist, aber es läßt sich bisher noch nicht entscheiden, ob der unterschiedliche $^{3}$H-UTP Einbau durch Initiierung, Verlängerung oder Ablösung verursacht wird. Deshalb wurde nach der Methode von Hyman and Davidson (1970), wie beschrieben bei Cedar and Felsenfeld (1973), die relative Anzahl der Initiierungsstellen in zwei verschiedenen Chromatinpräparationen von S. mytilus bestimmt. Bei dieser Methode wurde die RNS-Synthese in Abwesenheit von CTP gestartet, durch Zugabe von Ammoniumsulfat eine weitere Initiierung gestoppt und dann durch Zugabe von CTP die vollständige Transkription von einem RNS-Strang pro Initiierungsstelle erreicht.

Abbildung 8 zeigt, daß Mikronukleus-Chromatin eine signifikant geringere Zahl von Initiierungsstellen aufweist als Makronukleus-Chromatin. Unter den beschriebenen Bedingungen waren etwa 12 µg Makronukleus-Chromatin, aber 25 µg Mikronukleus-Chromatin nötig, um 3 Enzymeinheiten E. coli RNS-Polymerase zu sättigen.

Daraus läßt sich schließen, daß die unterschiedliche Templateaktivität auf eine unterschiedliche Anzahl von Initiierungsstellen, also auf eine geringere Zugänglichkeit zurückgeht.

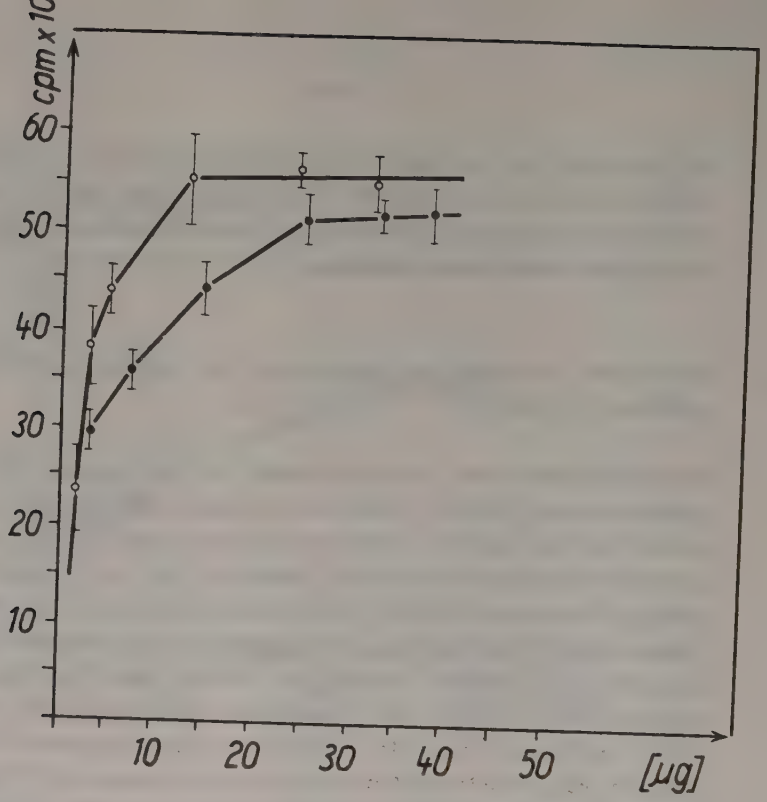



Abb. 8

Titration von E. coli RNS-Polymerase mit Stylonychia mytilus Makronukleus- und Mikronukleus-Chromatin. Zunehmende Konzentrationen von Makronukleus-Chromatin -o—o- oder Mikronukleus-Chromatin -●—●- wurden zu 3 EE E. coli RNS-Polymerase gegeben. Das Inkubationsmedium enthielt in 0,2 ml 10 mM Tris pH 7,9, 1 mM $MnCl_2$, je 0,08 mM ATP, GTP, UTP und 50 µCi/ml $^3$H-UTP. Nach 15 Min. wurde die Initiierung durch Zugabe von 64 µl 1,6 M $(NH_4)_2SO_4$ gestoppt. Die Ablösung der Transkripte in hohen Salzkonzentrationen wurde durch Zugabe von CTP (Endkonzentration 0,063 mM) und $MgCl_2$ (Endkonzentration 5 mM) erreicht (Cedar and Felsenfeld, 1973).

## 3.6. Templateaktivität von Makronukleus- und Mikronukleus-Chromatin mit E. coli und Weizenkeim RNS-Polymerase

Es ist bekannt, daß exogene E. coli RNS-Polymerase eukaryontisches Chromatin sehr unspezifisch transkribiert (Cedar and Felsenfeld, 1973; Paul, 1976; Zasloff and Felsenfeld, 1977), und daß ihre Effektivität sehr stark von den im Inkubationsmedium anwesenden Ionen abhängt. Um die Transkriptionsaktivität von S. mytilus Makro- und Mikronukleus-Chromatin mit einer heterologen, eukaryontischen RNS-Polymerase vergleichen zu können, wurde nach der Methode von Jendrisak and Burgess (1975) RNS-Polymerase aus Weizenkeim isoliert.

Die Ergebnisse zeigen, daß exogene RNS-Polymerase aus Weizenkeim S. mytilus Chromatin als Template annähernd gleich transkribiert wie E. coli RNS-Polymerase. Der scheinbare Unterschied des $^{3}$H-UTP Einbaus im Makronukleus-Chromatin dürfte auf experimentelle Schwankungen zurückzuführen sein. Offensichtlich ist die Zugänglichkeit der DNS im Chromatin für beide heterologen RNS-Polymerasen gleich.

## 3.7. $^{3}$H-UTP Einbau in ganze Makro- und Mikronuklei und Makronukleusanlagen

Die Funktion des Mikronukleus beim vegetativen Wachstum und der vegetativen Zellteilung ist noch weitgehend unbekannt. Es gibt Hinweise dafür, daß der Mikronukleus von S. mytilus in vivo, wenn überhaupt, nur eine sehr geringe RNS-Synthese aufweist (Ammermann, 1970). Auch die Tatsache, daß Mikronukleusfreie Klone lebensfähig sind, zeigt, daß sein Beitrag zum vegetativen Leben der Zelle nicht wesentlich sein kann. Aus diesen Gründen sollten "in vivo" ähnliche Versuchsbedingungen geschaffen und die Transkriptionsaktivität des Mikronukleus ohne exogene Polymerase untersucht werden. Parallel dazu wurden

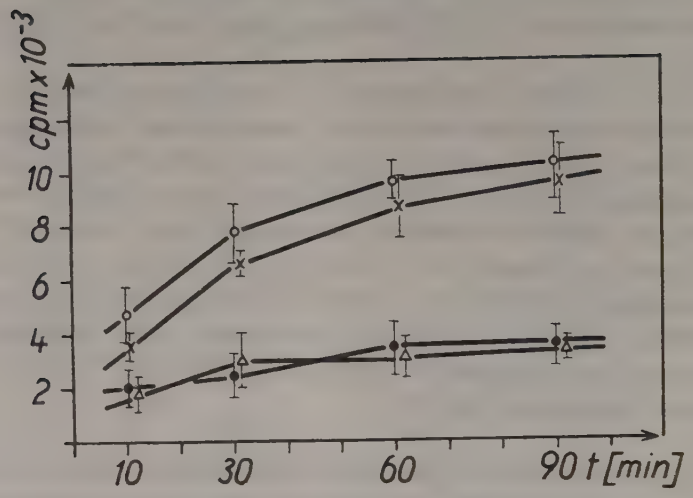



Abb. 9
Zeitkinetik des $^{3}$H-UTP Einbaus in S. mytilus Makronukleus- und Mikronukleus-Chromatin. Der Reaktionsansatz (0,2 ml) enthielt je 2 /ug Makronukleus- oder Mikronukleus-Chromatin und 10 EE E. coli oder Weizenkeim RNS-Polymerase. Für das Inkubationsmedium siehe Abb. 6.

-o—o- Makronukleus-Chromatin mit E. coli RNS-Polymerase
-x—x- " " " Weizenkeim RNS-Polymerase
-●—●- Mikronukleus-Chromatin mit E. coli RNS-Polymerase
-Δ—Δ- " " " Weizenkeim RNS-Polymerase

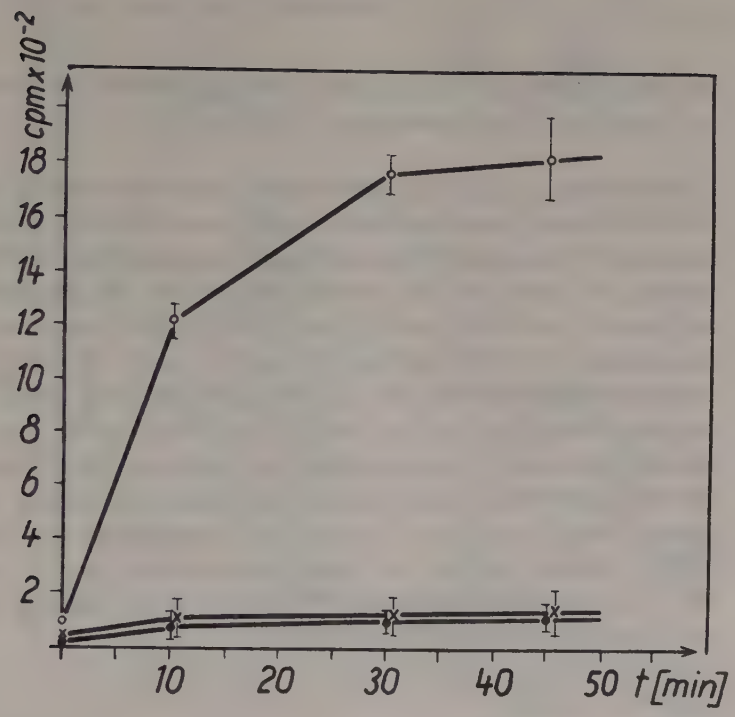



Abb. 10
$^{3}$H-UTP Einbau in Stylonychia mytilus Makro-, Mikronuklei und Makronukleusanlagen. Der Reaktionsansatz (0,5 ml) enthielt je 100 µg isolierte Makro-, Mikronuklei oder Makronukleusanlagen. Die Inkubation erfolgte bei 22° C in folgendem Inkubationsmedium: 3 mM $MgCl_2$, 2,7 mM L-Cystein, 4 mM $MnCl_2$, 50 mM $(NH_4)_2SO_4$, 120 mM KCl, 120 mM NaCl, je 0,1 mM CTP, GTP, 1,0 mM ATP und 20 µCi/ml $^{3}$H-UTP.

-o——o- Makronuklei
-•——•- Mikronuklei
-x——x- Makronukleusanlagen

Makronukleusanlagen im Riesenchromosomenstdium isoliert und unter gleichen Bedingungen inkubiert.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse eines zeitabhängigen $^{3}$H-UTP Einbaus wiedergegeben. Daraus ergibt sich, daß Mikronuklei und Makronukleusanlagen im Riesenchromosomenstadium nur etwa 5 % der Templateaktivität der Makronuklei zeigen. Der Unterschied im $^{3}$H-UTP Einbau zwischen Mikronuklei und Makronukleusanlagen ist nicht signifikant. In Mikronukleuspräparationen, die künstlich mit Makronuklei verunreinigt waren, stieg die Templateaktivität entsprechend der Verunreinigung an. Ob der sehr geringe $^{3}$H-UTP Einbau in Mikronuklei und Makronukleusanlagen letzten Endes nicht doch durch Verunreinigungen mit Makronuklei bedingt ist und ob diese beiden Kerne in vivo total inaktiv sind, läßt sich mit dieser Versuchsanordnung nicht absolut sicher entscheiden.

## 3.8. Größe des Transkripts

### 3.8.1. Makro- und Mikronukleus-Chromatin

#### 3.8.1.1. Bestimmung der Größe der Transkripte durch Sedimentation im Sucrosegradienten

Die Größe der in vitro von Makro- und Mikronukleus-Chromatin transkribierten RNS wurde durch Sedimentation im linearen 5 - 20 % Sucrosegradienten bestimmt. Nach 10 Minuten Inkubation wurde der Transkriptionsansatz von 0,200 ml mit 5 µg Makro- oder Mikronukleus-Chromatin als Template durch Zugabe von SDS und Baycovin in einer Endkonzentration von je 1 % gestoppt und anschließend die transkribierte $^{3}$H-RNS unmittelbar im Sucrosegradienten analysiert. Vorversuche ergaben, daß sich die Länge des Transkripts nach längeren Inkubationszeiten nicht wesentlich ändert.

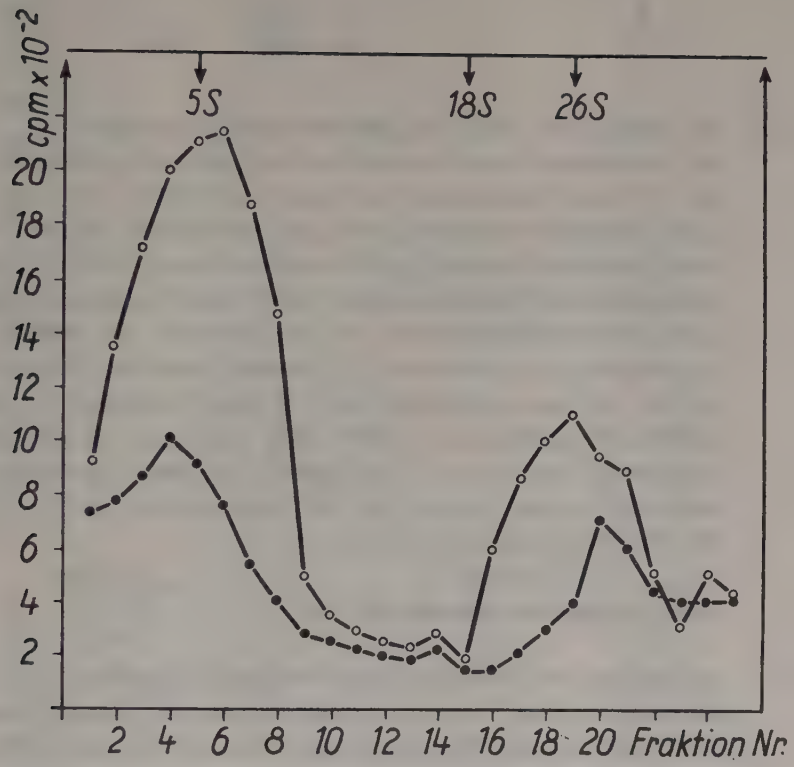



Abb. 11

Sucrosegradient der von Makronukleus-Chromatin _o——o- und Mikronukleus-Chromatin -●——●- transkribierten RNS. Nach 10 Minuten Inkubation (Inkubationsmedium siehe Abb. 5) wurde der Transkriptionsansatz von 0,200 ml mit 5 µg Makronukleus- oder Mikronukleus-Chromatin als Template durch Zugabe von SDS und Baycovin in einer Endkonzentration von je 1 % gestoppt. Je 100 µl des klaren Überstandes wurden auf 4,5 ml eines linearen Sucrosegradienten (5% - 20 %) geladen und 6 Stunden bei 50 000 rpm zentrifugiert. Nach dem Lauf wurden durch Austropfen 20 Fraktionen gesammelt und die TCA-fällbare Radioaktivität in den Fraktionen gemessen.

3.8.1.2. Bestimmung der Größe auf SDS-Polyacrylamid-Gelen
Die Auftrennung der transkribierten RNS erfolgte auch auf SDS-Polyacrylamid-Gelen wie oben beschrieben. Es wird deutlich, daß durch Transkription von isoliertem Chromatin vor allem niedermolekulare, mit einem geringen Anteil an höhermolekularer RNS synthetisiert wird. Dabei unterscheiden sich die Molekulargewichte der Transkripte von Makro- und Mikronukleus-Chromatin nicht. Dieses Ergebnis bestätigt, daß der unterschiedliche $^{3}$H-UTP Einbau in Makro- und Mikronukleus-Chromatin nicht durch eine unterschiedliche Transkriptlänge verursacht wird, sondern vielmehr durch eine unterschiedliche Anzahl von Initiierungsstellen für E. coli RNS-Polymerase bedingt ist.

3.8.2. Ganze Makro- und Mikronuklei

3.8.2.1. Bestimmung der Größe auf SDS-Polyacrylamid-Gelen
Makronuklei ohne heterologe RNS-Polymerase zeigen neben niedermolekularem Transkript im Vergleich zu isoliertem Makronukleus-Chromatin einen größeren höhermolekularen Anteil. Dieses Ergebnis ist vermutlich darauf zurückzuführen, daß die homologe RNS-Polymerase, die unter den gegebenen Versuchsbedingungen die RNS-Synthese steuerte, längere Transkripte liefert.

Abb. 12 und 13
Bestimmung der Größe der transkribierten RNS auf SDS-Polyacrylamid-Gelen.
-o—o- RNS, synthetisiert von Makronukleus-Chromatin
-●—●- RNS, " " Mikronukleus-Chromatin
-o—o- RNS, " " ganzen Makronuklei (Abb.13)

Abb. 12

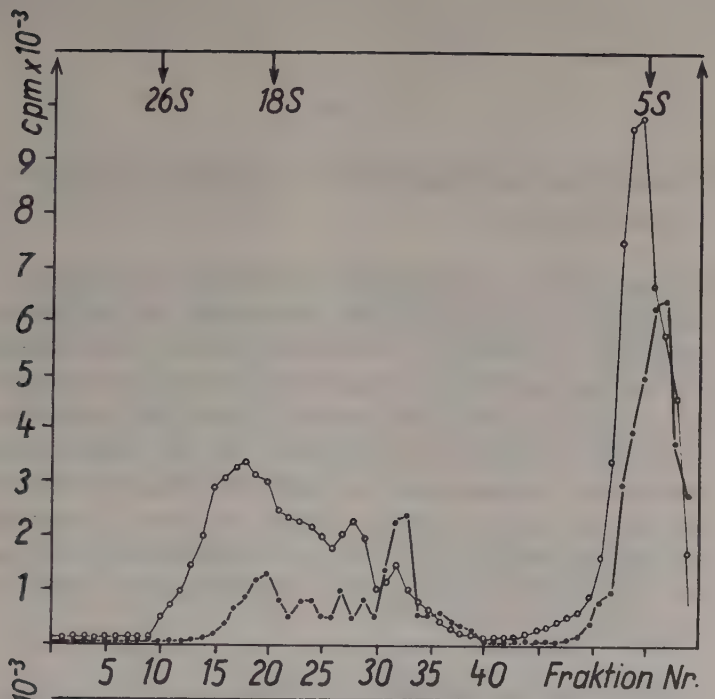
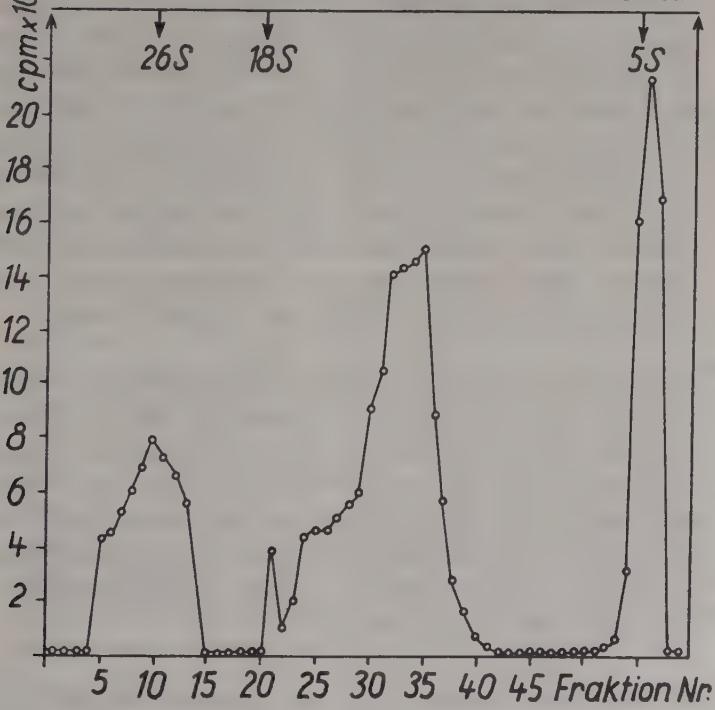

cpm x 10⁻³
26S
18S
5S
1
2
3
4
5
6
7
8
9
5 10 15 20 25 30 35 40
Fraktion Nr.

Abb. 13


cpm x 10⁻³
26S
18S
5S
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
5 10 15 20 25 30 35 40 45
Fraktion Nr.

## 3.9. Dissoziation und Rekonstitution von Makro- und Mikronukleus-Chromatin

Um Hinweise auf die Funktion der Kernproteine bei der Regulation der Transkription von Makro- und Mikronukleus-Chromatin zu erhalten, wurden Rekonstitutionsexperimente mit isoliertem Chromatin durchgeführt. Diese Methode wurde erstmals von Paul and Gilmour, 1968; und von Bekhor et al., 1969; angewandt. Sie basiert auf der Kenntnis, daß assoziierte Kernproteine in hoher Salskonzentration von der DNS dissoziiert werden können und dann in niederer Salzkonzentration ein reversibler Prozess abläuft, so daß sich Proteine und DNS, gemäß ihrer Affinität wieder rekonstituieren.

Durch die Entdeckung der Nukleosomen wurden die Ergebnisse der Rekonstitutionsexperimente mit Chromatin besser verständlich. Inzwischen konnten mehrere Arbeitsgruppen nachweisen, daß durch Mischen der Histonfraktionen H2A, H2B, H3 und H4 mit DNS in hoher Salzkonzentration, eine spezifische Assoziation in niederer Salzkonzentration erfolgt, wobei Oktamere gebildet werden, die jeweils 2 Moleküle der Histone enthalten (Germond et al., 1975; Griffith, 1975). Dies legt nahe, daß Nukleosomen reversibel dissoziiert und reassoziiert werden können.

Interessant war auch zu wissen, inwieweit die Nichthistonproteine, die für eine spezifische Repression verantwortlich gemacht werden, bei der Rekonstitution an ihre ursprüngliche oder äquivalente Stelle binden. Mit verschiedenen Techniken konnte gerade in der letzten Zeit eine sequenzspezifische Reassoziation der Nichthistone nachgewiesen werden (Gilmour and Paul, 1969; Huang and Huang, 1969; Chytil and Spelsberg, 1971).

Vielfach wurde gezeigt, daß die Dissoziation von Chromatin der Eukaryonten in 2 M NaCl und 5 M Harnstoff nahezu quantitativ ist, wobei NaCl vor allem eletrostatische Bindungs-

kräfte und Harnstoff hydrophobe und Wasserstoffbrückenbindungen beeinflußt.

Aus meinen Vorversuchen wurde jedoch deutlich, daß die Dissoziation von S. mytilus Makronukleus-Chromatin, vor allem aber von S. mytilus Mikronukleus-Chromatin in 2 M NaCl, 5 M Harnstoff nicht vollständig ist. Das isolierte Chromatin wurde daher wie oben beschrieben in 3 M NaCl und 5 M Harnstoff dissoziiert und anschließend durch Gradientendialyse rekonstituiert.

Abbildung 14 zeigt die Absorptionsspektren der verschiedenen Chromatinpräparationen von Makronukleus-Chromatin. Man erkennt, daß sich das Absorptionsverhältnis E 260 nm / 280 nm von 1,43 zu 1,80 und wieder zu 1,43 verändert. Ein Vergleich der Transkriptionsaktivität von Makro- und Mikronukleus-Chromatin der einzelnen rekonstituierten Fraktionen ist in Abbildung 15 dargestellt. Eine Aktivitätssteigerung des dissoziierten Makro- und Mikronukleus-Chromatins um etwa das 5-fache legt nahe, daß vor allem die Dissoziation des Mikronukleus-Chromatins in 3 M NaCl, 5 M Harnstoff nicht quantitativ sein kann, sondern noch irgendwelche Proteine die DNS reprimieren.

Klärung fand diese Hypothese durch eine Proteinbestimmung nach Lowry (1951), mit der für die Mikronukleusfraktion noch die doppelte Proteinkonzentration als in der entsprechenden Makronukleusfraktion nachgewiesen werden konnte. Auffällig ist auch, daß das rekonstituierte Material in beiden Chromatinpräparationen einen höheren $^{3}$H-UTP Einbau zeigt, verglichen mit nativem Chromatin. Wahrscheinlich wird dieser Effekt durch künstliche Bindungsstellen für exogene RNS-Polymerase verursacht, die während des Experiments entstehen, und deshalb keine vollständige Reassoziation stattfinden kann.

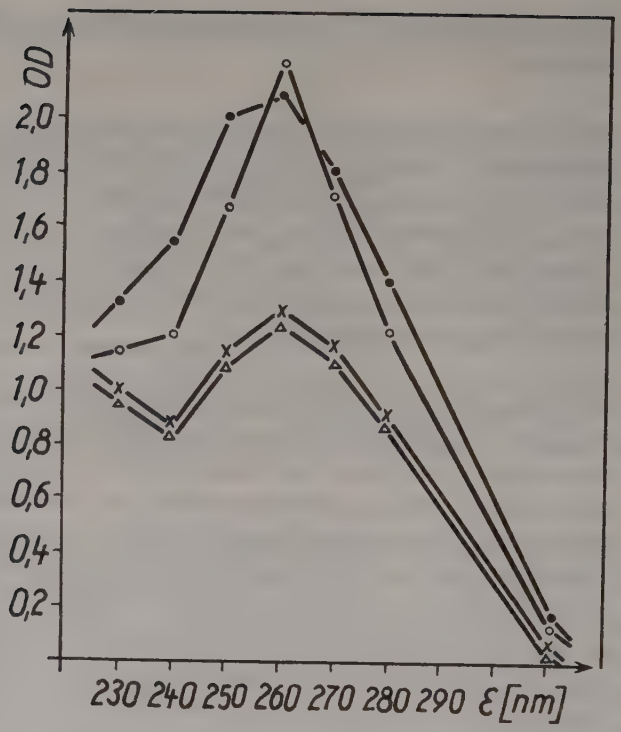



Abb. 14

Absorptionsspektren von S. mytilus Makronukleus-Chromatin

-x—x- Chromatin, nativ OD 260/280 = 1,43

-o—o- " dissoziiert in 3 M NaCl
5 M Harnstoff " = 1,80

-●—●- " rekonstituiert in 1 M NaCl " = 1,49

-Δ—Δ- " rekonstituiert in 10 mM Tris
pH 7,9 " = 1,43

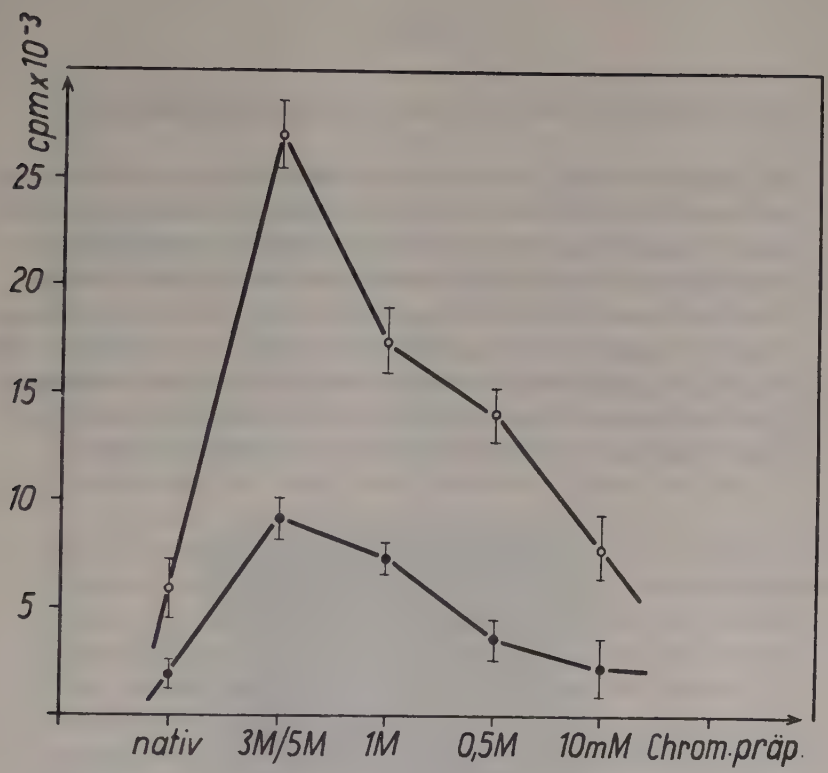



Abb. 15

$^{3}$H-UTP Einbau in S. mytilus Makro- und Mikronukleus-Chromatin. Die Chromatinpräparationen wurden in 3 M NaCl und 5 M Harnstoff dissoziiert und anschließend durch Gradientendialyse rekonstituiert. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei 37° C (Inkubationsmedium siehe Abb. 6).

-o—o- Makronukleus-Chromatin

-●—●- Mikronukleus-Chromatin

## 3.10. Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen

Durch Auftrennung der einzelnen rekonstituierten Fraktionen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen nach Laemmli (1970), konnte gezeigt werden, daß es in beiden Chromatinpräparationen vor allem Nichthistonproteine sind, die in der dissoziierten Fraktion noch an die DNS gebunden sind. Gut stimmt die Rekonstitution mit den Ergebnissen von Gilmour and Paul (1969), und von Huang and Huang (1969), überein, da das Bandenmuster des rekonstituierten Materials in beiden Chromatinpräparationen dem nativen Chromatin annähernd gleicht.

Abb. 16
Auftrennung von Proteinen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen
a: Makronukleus-Chromatin, nativ
b: " " , dissoziiert in 3 M NaCl, 5 M Harnst.
c: " " , rekonstituiert in 1 M NaCl
d: " " , rekonstituiert in 0,5 M NaCl
e: " " , rekonstituiert in 10 mM Tris pH 7,9
f: Mikronukleus-Chromatin, nativ
g: " " , dissoziiert in 3 M NaCl, 5 M Harnst.
h: " " , rekonstituiert in 1 M NaCl
i: " " , rekonstituiert in 0,5 M NaCl
j: " " , rekonstituiert in 10 mM Tris pH 7,9

## 4. DISKUSSION

In den letzten Jahren haben mehrere Arbeitsgruppen versucht, aktives von inaktivem Chromatin zu trennen und die Beziehung zwischen Struktur und Funktion bei der Genregulation zu klären (Gottesfeld et al., 1974; Gottesfeld et al., 1975; Magee et al., 1975; Garel and Axel, 1976; Neelin et al., 1976; Weintraub and Groudine, 1976). Obwohl dadurch einige neue Informationen über die Chromatinstruktur erlangt wurden (Kornberg, 1977; Felsenfeld, 1978), konnte bis heute keine zufriedenstellende Fraktionierung von aktivem und inaktivem Chromatin erreicht werden.

Der hypotriche Ciliat Stylonychia mytilus, mit seinen generativen, stoffwechselphysiologisch nahezu inaktiven Mikronuklei und seinem somatischen, stoffwechselphysiologisch aktiven Makronukleus könnte ein ausgezeichnetes System bieten, aktives und inaktives Chromatin zu untersuchen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß S. mytilus Makronukleus-Chromatin, ebenso wie isoliertes Kalbsthymus-Chromatin, bei der Transkription in vitro etwa 10 % der Templatektivität von isolierter Makronukleus-DNS besitzt. Diese Ergebnis stimmt mit den Untersuchungen von Bonner et al., 1968; Koslov and Georgiev, 1970; Kurashina et al., 1970; an Chromatin von mehreren Eukaryonten überein. Daß Makronukleus-Chromatin die gleiche Templateaktivität wie "typisches" Eukaryonten-Chromatin aufweist, war überraschend, denn in anderen Eigenschaften ist der Makronukleus ja durchaus kein typischer Eukaryonten-Kern (Fehlen repetetiver Sequenzen, "gene-sized" DNS-Moleküle anstatt Chromosomen). Der Mikronukleus hingegen, der als der "typische" Eukaryonten-Kern der Ciliaten angesehen wird, hat in vitro eine viel geringere Templateaktivität (30 % - 60 % von Makronukleus-Chromatin).

Es bieten sich hier nun im wesentlichen zwei Möglichkeiten, diesen signifikanten Unterschied in der Templateaktivität

zu erklären. Entweder kann eine unterschiedlich gebaute DNS in den verschiedenen Kernen von S. mytilus die Ursache für diese Beobachtung sein, oder die Regulation der Transkriptionsaktivität erfolgt auf der Ebene der Chromatinstruktur. Molekuargewichtsbestimmungen zeigten, daß die Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-DNS im Vergleich zu Makronukleus-DNS wesentlich höhermolekularer sind. Die Templateaktivität von isolierter DNS aus allen drei Kerntypen ist jedoch fast identisch, was nahelegt, daß die unterschiedliche Transkriptionsaktivität des Chromatins auf eine unterschiedliche Zugänglichkeit für RNS-Polymerase zurückzuführen ist. Die Tatsache, daß Mikronukleus-Chromatin nur etwa halb so viele Initiierungsstellen besitzt als Makronukleus-Chromatin, ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die DNS im Mikronukleus-Chromatin unzugänlicher ist als im Makronukleus-Chromatin (Riewe and Lipps, 1977). In diesem Zusammenhang muß man im Auge behalten, daß den "gene-sized" DNS-Stücken des Makronukleus diskrete Chromatinfragmente entsprechen, die im Durchschnitt 18 Nukleosomen lang sind (DNS-Molekulargewicht eines solchen Stückes $2{,}6 \times 10^6$ Dalton) (Elsevier et al., 1978; Lipps and Steinbrück, 1978; Lipps et al., in press). Im Gegensatz dazu liegt das Mikronukleus-Chromatin hochmolekular und sehr kondensiert vor, vergleichbar vielleicht mit dem Chromatin eines Spermiums. Die Möglichkeit, die unterschiedliche Templateaktivität durch die Produktion verschieden langer Transkripte zu erreichen, ist nicht gegeben, da von Makro- und Mikronukleus-Chromatin Transkripte mit vergleichbaren Molekulargewichten synthetisiert werden.

Es ist zu beachten, daß eine Interpretation von Transkriptionsversuchen in vitro mit exogener E. coli RNS-Polymerase schwierig und nur beschränkt möglich ist, da bekannt ist, daß dieses Enzym eukaryontisches Chromatin mit einer sehr begrenzten Spezifität transkribiert und daß seine Effektivität sehr stark von den im Inkubations-

medium anwesenden Ionen abhängt (Cedar and Felsenfeld, 1973; Paul, 1976; Zasloff and Felsenfeld, 1977). Interessant schien deshalb, Transkriptionsversuche mit einer eukaryontischen RNS-Polymerase durchzuführen. Der Vergleich der Templateaktivität in vitro mit RNS-Polymerase aus Weizenkeim ergab, daß der $^{3}$H-UTP Einbau in Makro- und Mikronukleus-Chromatin nicht von den Ergebnissen mit exogener E. coli RNS-Polymerase abweicht, was darauf hindeutet, daß die DNS im Mikronukleus-Chromatin für diese heterologe RNS-Polymerase genauso unzugänglich ist wie für die prokaryontische E. coli RNS-Polymerase.

Da Transkriptionsversuche in vitro nur unvollkommen die wirklichen Verhältnisse, die in der Zelle herrschen, wiedergeben, wurden "in vivo" ähnliche Versuchsbedingungen geschaffen und $^{3}$H-UTP in ganze Makro- und Mikronuklei und Makronukleusanlagen eingebaut. Es zeigt sich, daß der Mikronukleus und auch die Makronukleusanlage nur eine sehr geringe Templateaktivität aufweisen, durchschnittlich etwa 5 %, bezogen auf den Makronukleus. Da diese beiden Kerne in vivo nur eine sehr geringe RNS-Synthese zeigen, passen die Ergebnisse gut zusammen. Allerdings kann die Möglichkeit nicht ausgeschlossen werden, daß der sehr geringe $^{3}$H-UTP Einbau in die Mikronuklei und die Makronukleusanlagen durch Verunreinigungen der Präparationen mit Makronuklei verursacht wurde. Die Kernpräparationen wurden zwar vor den Einbauversuchen lichtmikroskopisch geprüft, es reichen jedoch wenige Makronuklei auf mehrere tausend Mikronuklei, um diesen geringen Einbau vorzutäuschen. Es könnte also sein, daß völlig reine Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Präparationen gar keinen Einbau zeigen.

Die Diskrepanz zu den Ergebnissen der $^{3}$H-UTP Einbauversuche in Chromatin in vitro läßt sich vielleicht so er-

klären, daß durch die Chromatinpräparation künstliche Bindungsstellen für RNS-Polymerase geschaffen werden und so ein geringer $^{3}$H-UTP Einbau stattfinden kann (denkbar wären mechanische Kräfte, die vor allem das höhermolekulare Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Chromatin scheren könnten, aber auch ein enzymatischer Abbau ist möglich).

Im Einklang damit steht die Größe des Transkripts, die im isolierten Chromatin von Makro- und Mikronuklei nahezu gleich und neben höhermolekularen Anteilen vor allem niedermolekular ist, während in ganzen Makronuklei längere Transkripte synthetisiert werden.

Die Regulation der Transkriptionsaktivität im Chromatin von Eukaryonten-Zellen ist eine grundlegende Frage der Molekularbiologie, die bis jetzt, trotz vielseitigem Bemühen, noch nicht eindeutig beantwortet werden kann. Man kennt seit kurzem mehrere Theorien, die Erklärungsmöglichkeiten bieten. So konnte Kleinsmith et al. (1976), an S - Phase HeLa - Zellen durch Dephosphorylierung der Nichthiston-Proteine eine um 50 % geringere Templateaktivität und eine ähnliche Reduktion der Anzahl der Initiierungsstellen zeigen. Weitere Erkenntnisse wurden durch Rekonstitutionsexperimente mit Kalbsthymus-Chromatin erlangt, die zeigten, daß allein mit Histonen assoziierte DNS überhaupt keine RNS-Synthese aufweist. Aufgrund dieser Tatsachen wurde die Vorstellung entwickelt, daß durch Histone eine vollständige Repression des Templates erfolgt (Masking - Hypothese von Paul and Gilmour, 1968). In DNS-Nichthistonprotein-Komplexen war ein $^{3}$H-UTP Einbau zu beobachten, der jedoch geringer als der von reiner DNS war. Dies legt nahe, daß Nichthistone die vollständige Repression des Templates durch Histone verhindern und eine Gruppe der Nichthistone die Transkription spezieller DNS-Sequenzen möglicherweise aktivieren.

Durch Fraktionierung von Chromatin nach der Methode von Gottesfeld et al., (1974) konnten Lau and Ruddon (1977)

an Friends Erythroleukemia-Zellen in einer aktiven Fraktion einen geringen Histon H1 Anteil und in einer weitgehend inaktiven Fraktion einen signifikant geringeren Nichthiston-Protein Anteil nachweisen. Diese Ergebnisse, zusammen mit elektronenmikroskopischen Beobachtungen (Felsenfeld, 1978) legen nahe, daß vor allem H1 eventuell zusammen mit bestimmten Nichthiston-Proteinen durch Ausbildung räumlicher Strukturen im Chromatin die Zugänglichkeit für RNS-Polymerase vermindern. Der genaue Mechanismus ist aber noch weitgehend ungeklärt.

In dieser Arbeit wurden Rekonstitutionsexperimente mit isoliertem Makro- und Mikronukleus-Chromatin von Stylonychia mytilus durchgeführt. Nach Dissoziation in 3 M NaCl und 5M Harnstoff wurde ein etwa fünf Mal höherer $^{3}$H-UTP Einbau gefunden, der anschließend in niederer Salzkonzentration bis fast auf den Ausgangswert zurückging. Angesichts der oben erwähnten Ergebnisse scheint diese Aktivitätssteigerung noch relativ gering. Eine Auftrennung der Chromatinfraktionen durch Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese und eine Proteinbestimmung nach der Methode von Lowry (1951) zeigten jedoch, daß die Dissoziation der DNS-gebundenen Proteine nicht quantitativ war. Vor allem konnte gezeigt werden, daß der Proteingehalt im Mikronukleus-Chromatin nach der Dissoziation noch doppelt so hoch war wie im entsprechend behandelten Makronukleus-Chromatin, und daß es sich bei diesen Proteinen im wesentlichen um Nichthiston-Proteine handelte. Der DNS-Protein Komplex im Mikronukleus ist offenbar besonders fest und schwerer auftrennbar als bei normalem Eukaryonten-Chromatin.

Die Isolierung, Fraktionierung und Charakterisierung der Histone des Makronukleus und der Makronukleusanlage von Stylonychia mytilus ist bei Lipps et al., (1974) and Lipps and Handtke, (1975) beschrieben. Danach lassen sich die Histone des Ciliaten in 5 Fraktionen trennen, deren Molekulargewichte und Aminosäurezusammensetzung Histonfraktionen von Kalbsthymus-Chromatin sehr ähnlich sind. Dem-

gegenüber sind die Histone des Mikronukleus extrem schwer zu isolieren und wurden daher bis jetzt nicht weiter charakterisiert. Vielleicht sind sie mit den Proteinen im ebenfalls nahezu inaktiven Mikronukleus von Oxytricha zu vergleichen. In diesem Kern ist die DNS mit basischen Proteinen assoziiert, die jedoch sowohl in ihrem elektrophoretischen Verhalten, als auch in ihrer Aminosäurezusammensetzung von Histonen abweichen (Caplan, 1977).

Noch ist es nicht möglich, Genaktivierung und Chromatinstruktur bei Eukaryonten zu korrelieren. Diese Arbeit hat jedoch gezeigt, daß Ciliaten, in denen ein transkriptionsaktiver und ein weitgehend transkriptionsinaktiver Kern innerhalb einer Zelle vorkommt, ein ausgezeichnetes System bieten, Regulationsprozesse der Templateaktivität zu untersuchen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In dieser Arbeit wurde die Templateaktivität in vitro von reiner DNS, Chromatin und ganzen Kernen von Stylonychia mytilus untersucht. Dabei stand im Vordergrund ein Vergleich der verschiedenen Kerne dieses Ciliaten (Makronukleus, Mikronukleus und Makronukleusanlage).

Von Kalbsthymus, S. mytilus Makro- und Mikronuklei wurde die DNS isoliert und die Templateaktivität ermittelt. Sie stimmte bei allen DNS-Präparationen annähernd überein.

Es konnte gezeigt werden, daß Makronukleus-Chromatin etwa 10 % der Templateaktivität von Makronukleus-DNS aufweist. Der $^{3}$H-UTP Einbau in Chromatinpräparationen von Makro- Mikronuklei und Makronukleusanlagen in verschiedenen Inkubationsmedien ergab, daß Mikronukleus- und Makronukleusanlagen-Chromatin mit E. coli RNS-Polymerase nur etwa 30 % - 60 % der Templateaktivität des Makronukleus-Chromatins aufweist. Der $^{3}$H-UTP Einbau in ganze Kerne unter "in vivo" ähnlichen Versuchsbedingungen ergab für Mikronuklei und Makronukleusanlagen eine sehr geringe RNS-Synthese Rate (etwa 5 % des Makronukleus).

Zur Klärung der Frage, welche Ursache für die unterschiedliche Templateaktivität verantwortlich sein kann, wurden folgende Versuche gemacht:

Auf SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde die Größe des Transkripts bestimmt. Dabei wurde deutlich, daß sich die Molekulargewichte der Transkripte von Makro- und Mikronukleus-Chromatin mit E. coli RNS-Polymerase nicht unterscheiden, und daß, neben einem geringen höhermolekularen Anteil vor allem niedermolekulare RNS synthetisiert wird. Makronuklei ohne heterologe RNS-Polymerase zeigen neben niedermolekularem Transkript im Vergleich zu isoliertem Makronukleus-Chromatin einen größeren höhermolekularen Anteil.

Es konnte nachgewiesen werden, daß die Anzahl der Initiierungsstellen im Mikronukleus-Chromatin um etwa 50 % geringer ist, als im entsprechend behandelten Makronukleus-Chromatin.

Eine Inkubation der verschiedenen Chromatinpräparationen mit E. coli- oder Weizenkeim RNS-Polymerase ergab keinen signifikanten Unterschied.

In Rekonstitutionsversuchen wurde Chromatin in hoher Salzkonzentration dissoziiert und anschließend durch Gradientendialyse in niederer Salzkonzentration reassoziiert. In dissoziiertem Makro- und Mikronukleus-Chromatin wurde eine 5-fache Steigerung der Templateaktivität beobachtet. Die Auftrennung der einzelnen rekonstituierten Fraktionen auf SDS-Polyacrylamid-Gelen ergab, daß die Dissoziation von Makro- und Mikronukleus-Chromatin nicht quantitativ war, und daß es vor allem Nichthiston-Proteine sind, die in der dissoziierten Fraktion noch an die DNS gebunden sind.

Angesichts der in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse wurde der Einfluß der Chromatinstruktur auf die Genaktivierung im Eukaryonten-Genom diskutiert.

## 6. ABKÜRZUNGEN

| | |
|---|---|
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat $Na_2$-Salz |
| C | Konzentration in Mol x $l^{-1}$ |
| $^oC$ | Temperatur in Grad Celsius |
| Ci | Curie |
| mCi | Millicurie |
| CTP | Cytidin-5'-triphosphat $Na_2$-Salz |
| DNS | Desoxyribonucleinsäure |
| DTE | Dithioerythrit |
| $E_{260}$ | Extinktion bei UV-Licht von 260 nm Wellenlänge |
| E. coli | Escherichia coli (Bakterium) |
| EDTA | Äthylendiamintetraessigsäure |
| G1 | Phase des Zellcyclus |
| g | Gramm |
| x g | Vielfaches der Erdbeschleunigung |
| GC | Guanin- und Cytosingehalt von DNS oder RNS in Mol % |
| GTP | Guanosin-5'-triphosphat $Na_2$-Salz |
| l | Liter |
| m | Meter |
| M | Molar |
| mA | Milliampere |
| mg | Milligramm |
| min | Minuten |
| ml | Milliliter |
| mm | Millimeter |
| mM | Millimolar |
| /um | Mikrometer = $10^{-6}$ Meter |
| ng | Nanogramm = $10^{-9}$ Gramm |
| nm | Nanometer = $10^{-9}$ Meter |
| PVP | Polyvinylpyrrolidon |
| RNase | Ribonuclease |
| RNS | Ribonukleinsäure |
| cRNS | komplementäre, von DNS-Matrize in vitro transkribierte RNS |
| rRNS | ribosomale RNS |

| | |
|---|---|
| 17S + 25S | Sedimentationskonstanten der rRNS-Moleküle von 0,7 x $10^6$ bzw. 1,3 x $10^6$ Dalton Molekulargewicht |
| tRNS | Transfer-RNS |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunden |
| SSC | Standard Saline Citrate = 0,15 M NaCl, 0,01 M Natriumcitrat |
| t | Zeit |
| T | Temperatur |
| TCA | Trichloressigsäure |
| UTP | Uridin-5'-triphosphat $Na_3$-Salz |

## 7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Alfert, M. and Das, N.K. (1959): Autoradiographic studies of RNA metabolism in Tetrahymena pyriformis. Anat. Rec. 134, 523

Allfrey, V.G., Littau, V.C. and Mirsky, A.E. (1963): On the role of histones in regulating ribonucleic acid synthesis in the cell nucleus. Proc. Nat. Acad. Sci., Wash. 49, 414 - 421

Allfrey, V.G. (1976): The structure of chromatin. In: Organization and expression of chromosomes; Dahlem Konferenzen 4, 19 - 27 Ed. Allfrey, V.G., Bautz, E.H.F., Mc Carthy, B.J., Schimke, R.T., Tissieres, A.

Ammermann, D. (1965): Cytologische und genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonychia mytilus Ehrenberg. Arch. Protistenk. 108, 109 - 152

Ammermann, D. (1970): The micronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus; its nucleic acid synthesis and its function. Exp. Cell Res. 61, 6 - 12

Ammermann, D., Steinbrück, G., v.Berger, L. and Hennig, W. (1974): The develoment of the macronucleus in the ciliated protozoan Stylonychia mytilus. Chromosoma 45, 401 - 429

Barrett, T., Moryanka, D., Hanlyn, P. and Gould, H.J. (1973): Nonhistone proteins control gene expression in reconstituded chromatin. Proc. Nat. Acad. Sci., USA 71, 5047

Bekhor, I., Kung, G.M. and Bonner, J. (1969): Sequence-specific interaction of DNA and chromosomal protein. J. Mol. Biol. 39, 351 - 364

Blüthmann, H. (1973): Einfluß von Nichthiston-Proteinen auf die Regulation der Templateaktivität. Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen

Blüthmann, H., Mrozek, S. and Gierer, A. (1975): Non-histone chromosomal proteins. Their isolation and role in determining specifity of transcription in vitro. European Journal of Biochemistry 58, 315 - 326

Bonner, J., Dahmus, M.E. Fambrough, D., Huang, R.C.C., Marushige, K. and Tuan, D.Y.H. (1968): The biology of isolated chromatin. Science 159, 47 - 56

Burgess, R.R. (1969): A new method for the large scale purification of Escherichia coli deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase. J. Biol. Chem. 244, 6160 - 6167

Burton, K. (1968): Determination of DNA concentration with diphenylamin. In: Meth. Enzymol. 12, 163 - 166 Ed. Grossman, L. and Moldave, K.; Academic Press Inc., New York

Caplan, E.B. (1977): Histones and other basic nuclear proteins in genetically active and genetically inactive nuclei of the ciliate Oxytricha sp. Biochimica et Biophysica Acta 479, 214 - 219

Cedar,H. and Felsenfeld, G. (1973): Transcription of chromatin in vitro. J. of Molecular Biology 77, 237 - 254

Chiu, J.F., Tsai, Y.H., Sakuma, K. and Hnilica, L.S. (1975): Regulation of in vitro mRNA transcription by a fraction of chromosomal proteins.
The Journ. of Biol. Chem. 250, 9431 - 9433

Chytil, F. and Spelsberg, T.C. (1971): Tissue differences in antigenic properties of non-histone protein-DNA complexes.
Nature New Biol. 223 215

De Lange, R.J. and Smith, E.L. (1975): Histone function and evolution as viewed by sequence studies.
In the structure and function of chromatin,
Ciba Foundation Symposium 28, 59 - 76

Elgin, S.C.R. and Weintraub, H. (1975): Chromosomal proteins and chromatin structure.
Annual Review in Biochem. 44, 725 - 774

Elsevier, S.M., Lipps, H.J. and Steinbrück, G. (1978): Histone genes in the macronucleus of Stylonychia mytilus.
Chromosoma, im Druck.

Felsenfeld, G. (1978): Chromatin
Nature 271, 115 - 122

Frenster, J.H. (1965): Nuclear polyanions as de-repressors of synthesis of ribonucleic acid.
Nature 206, 680 - 683

Garel, A. and Axel, R. (1976): Selective digestion of transcriptionally active ovalbumin genes from oviduct nuclei.
Proc. of the Nat. Acad. of Sci. (Wash.) 73, 3966 - 3970

Germond, J.E., Hirt, P., Oudet, P., Gross-Bellard, M. and Chambon, P. (1975): Folding of the DNA double-helix in chromatin-like structures from simian virus 40. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 72, 1843 - 1847

Gorovsky, M. (1965): Electron microscopic cytochemistry of isolated nuclei of Tetrahymena. J. Cell Biol. 27, 37

Gorovsky, M. and Woodard, J. (1968): Radioautographic studies of RNA synthesis in macro- and micronuclei of Tetrahymena. J. Cell Biol. 39, 54

Gorovsky, M. and Woodard, J. (1969): Studies on nuclear structure and function in Tetrahymena pyriformis. I. RNA synthesis in macro- and micronuclei. J. Cell Biol. 42, 673

Gottesfeld, J.M. Garrard, W.T., Bagi, G., Wilson, R.F. and Bonner, J. (1974): Partual purification of the template-active fraction of chromatin. Proc. of the Nat. Acad. Sci. (Wash.) 71, 2193 - 2197

Gottesfeld, J.M., Murphy, R.F. and Bonner, J. (1975): Structure of transcriptionally aktive chromatin. Proc. of the Nat. Acad. of Sci. (Wash.) 72, 4404 - 4408

Griffith, J.B. (1975): Chromatin structure: deduced from a minichromosome. Science 187, 1202 - 1203

Hennig, W., Hennig, I. and Stein, H. (1970): Repeated sequences in the DNA of Drosophila and their localisation in giant chromosomes. Chromosoma (Berl.) 32, 31 - 63

Huang, R.C.C. and Bonner, J. (1962): Histone, a suppressor of chromosomal RNA synthesis.
Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.) 48, 1216 - 1222

Huang, R.C. and Huang, P.C. (1969): Effect of protein-bound RNA associated with Chick embryo chromatin on template specificity of the chromatin.
J. Mol. Biol. 39, 365 - 378

Hyman, R.W. and Davidson, N. (1970): Kinetics of the in vitro inhibition of transcription by actinomycin
J. of Mol. Biol. 50, 421 - 438

Jendrisak, J.J. and Burgess, R.R. (1975): A new method for the large scale purification of Wheat germ DNA-dependent RNA polymerase II.
Biochem. 14, 4639 - 4645

Johns, E.W. and Forrester, S. (1969): Studies on nuclear proteins. The binding of extra acidic proteins to deoxyribonucleoprotein during the preparation of nuclear proteins.
Eur. J. Biochem. 8, 547 - 551

Kimball, R.F. (1964): Physiological genetics of the ciliates.
In: Biochemistry and Physiology of Protozoa
Ed. Hutner, S.H. Acad. Press Inc., New York 3, 243

Kleinsmith, L.J., Stein, J. and Stein, G. (1976): Dephosphorylation of nonhistone proteins specifically alters the pattern of gene transcription in reconstituted chromatin.
Proc. Nat. Acad. Sci, 73, 1174 - 1178

Kornberg, (1977): Structure of chromatin.
Ann. Rev. Biochem. 46, 931 - 954

Koslov, Y.V. and Georgiev, G.P. (1970): Mechanism of inhibitory action of histones on DNA template akttivity in vitro
Nature 228, 245 - 247

Kurashina, Y., Ohba, Y. and Mizuno, D. (1970): Template aktivity of partually dehistoniced nucleohistones for DNA dependent RNA polymerase.
J. Biochem. 67, 661 - 665

Laemmli, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227, 680 - 689

Lau, A.F. and Ruddon, R.W. (1977): Proteins of transcriptionally aktive and inaktive chromatin from Friend Erythroleukemia cells.
Exp. Cell Res. 107, 35 - 46

Lipps, H.J., Sapra, G.R. and Ammermann, D. (1974): The histones of the ciliated protozoan Stylonychia mytilus.
Chromosoma (Berl.) 45, 273 - 280

Lipps, H.J. and Hantke, K.G. (1975): Studies on the histones of the ciliate Stylonychia mytilus.
Chromosoma (Berl.) 49, 309 - 320

Lipps, H.J. and Morris, N.R. (1977): Chromatin structure in the nuclei of the ciliate Stylonychia mytilus.
Biochem. and Biophys. Res. Communic. 74, 230 - 234

Lipps, H.J. and Steinbrück, G. (1978): Free genes for rRNAs in the macronuclear genome of the ciliate Stylonychia mytilus.
Chromosoma (Berl.) 69, 21 - 26

Lipps, H.J., Nock, A., Riewe, M. and Steinbrück, G. (in press): Chromatin structure in the macronucleus of the ciliate Stylonychia mytilus.
Nucleic Acid Research

Loenning, U.E. (1967): The fractionation of high-molecular-weight ribonucleic acid by polyacrylamid-gel electrophoresis.
Biochem. J. 102, 251 - 257

Lowry, (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent.
J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

Magee, B.B., Paoletti, J. and Magee, P.T. (1975): Separation of lymphocyte chromatin into template aktive fractions with specificity for eucaryotic RNA polymerase II or procaryotic RNA polymerase.
Proc. of the Nat. Acad. of Sci. (Wash.) 72, 4830 - 4834

Marushige, K. and Bonner, J. (1966): Template properties of liver chromatin.
J. Mol. Biol. 15, 160 - 174

Moses, M.J. (1950): Nucleic acids and proteins of the nuclei of Paramecium.
J. Morphol. 87, 493 - 526

Murti, K.G. and Prescott, D.M. (1970): Micronuclear ribonucleic acid in Tetrahymena pyriformis.
The Journal of Cell Biol. 47, 460 - 467

Neelin, J.M., Mazen, A. and Champagne, M. (1976): The fractionation of aktive and inaktive chromatins from erythroid cells of Chicken.
FEBS Letters 65, 309 - 314

Nüßlein, C. and Heyden, B. (1977): Chromatography of RNA polymerase from Escherichia coli on single stranded DNA-agarose columns.
Biochem. and Biophys. Res. Communic. 47, 282 - 289

Pasternak, J. (1967): Differential genetic aktivity in Paramecium aurelia.
J. Exp. Zool. 165, 395 - 417

Paul, J. and Gilmour, R.S. (1968): Organ-specific restriction of transcription in Mammalian chromatin.
J. of Molecul. Biol. 34, 305 - 316

Paul, J., Gilmour, R.S., Affara, N., Birnie, G.D., Harrison, R.R., Hell, A., Humphries, S., Windass, J.D. and Young, B.D. (1973): The globin gene: structure and expression.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 38, 885 - 890

Paul, J. (1976): Transcription of rekonstituted chromatin.
In: Organization and Expression of Chromosomes
Ed. Allfrey, V.G., Bautz, E.H.F.,Mc. Carthy, B.J., Schimke, R.T.,Tissieres, A.
Dahlem Konferenzen 4, 317 - 329

Prescott, D.M., Murti, K.G. and Bostock, C.J. (1973): Genetic apparatus of Stylonychia sp.
Nature (Lond.) 242, 597 - 600

Rao, M.V.N. and Prescott, D.M. (1967): Micronuclear RNA synthesis in Paramecium caudatum.
J. Cell Biol. 33, 281 - 285

Riewe, M. and Lipps, H.J. (1977): Template aktivity of macronuclear and micronuclear chromatin of the ciliate Stylonychia mytilus.
Cell Biol. Int. Rep. 1, 517 - 525

Solage, A. and Cedar, H. (1976): RNA chain elongation on a chromatin template.
Nucleic Acid Research 3, 2223 - 2231

Sonneborn, T.M. (1954): Is gene K aktive in the micronucleus of Paramecium?
Microbiol. Genet. Bull. 11, 25

Spelsberg, T.C., Steggles, A.W., Chuytil, F. and O'Malley, B.W. (1972): Progesterone-binding components of Chick oviduct.
J. Biol. Chem. 247, 1368 - 1374

Stein, J.L., Reed, K. and Stein, G.S. (1976): Effect of histones and nonhistone chromosomal proteins on the transcription of histone genes from HeLa $S_3$ cell DNA.
Biochem. 15, 3291 - 3295

Steinbrück, G. (1976): Untersuchungen zur Organisation des Genoms von Stylonychia mytilus (Ciliata).
Dissertation im Fachbereich Biologie der Universität Tübingen

Thomas, J.V. (1978): Chromatin structure.
Biochem. of Nuc. Aci. II 17, 181 - 232

Weintraub, H. and Groudine, M. (1976): Chromosomal subunits in aktive genes have an altered conformation.
Science 193, 848 - 856

Wilson, G.N., Steggles, A.W., Kantor, J.A., Nienhuis, A.W. and Anderson, W.F. (1975): Cell-free transcription of Mammalian chromatin.
The Journ. of Biol. Chem. 250, 8604 - 8613

Zasloff, M. and Felsenfeld, G. (1977): Use of mercury-substituted ribonucleoside triphosphates can lead to artefacts in the analysis of in vitro chromatin transcripts.
Biochem. and Biophys. Re. Communic. 75, 598 - 603

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten

D. Ammermann
E. Bayer
F. W. Bentrup
K. G. Grell
D. Krug
E. Kulzer
H. J. Lipps
H. Metzner
G. Mickoleit
F. P. Möhres
E. Müller
D. Oelkrug
W. Rüdorff
F. Seelig
H. Stegmann
B. Schwemmle

## L E B E N S L A U F

| | |
|---|---|
| 17. 07. 1951 | Geboren in Sindelfingen |
| 1958 - 1966 | Besuch der Volksschule in Darmsheim |
| 1966 - 1969 | Besuch der Höheren Handelsschule in Böblingen |
| 1969 - 1972 | Besuch des Wirtschaftsgymnasiums in Böblingen |
| Juni 1972 | Abitur |
| 1972 - 1978 | Studium der Biologie und Chemie an der Universität Tübingen |
| 30. 05. 1978 | Wissenschaftliche Prüfung für das Lehramt an Gymnasien in den Fächern Chemie/Biologie |
| Anschliessend | Dissertation am Institut für Biologie III, Abt. Zellbiologie, der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Professor Dr. D. Ammermann, Thema der Arbeit: "Templateaktivität von Makro- und Mikronukleus-Chromatin des Ciliaten Stylonychia mytilus". |